

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Estudio cronobiológico de la respuesta farmacológica y la variación de
parámetros hemodinámicos de la combinación Etomidato-Midazolam
en perros y gatos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marcelo Adrián Priotto

Directores

María Dolores de San Andrés Larrea
Manuel I. de San Andrés Larrea

Madrid, 2016



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

Facultad de Veterinaria
Departamento de Toxicología y Farmacología

**ESTUDIO CRONOBIOLOGICO DE LA RESPUESTA
FARMACOLOGICA Y LA VARIACION DE PARÁMETROS
HEMODINÁMICOS DE LA COMBINACIÓN ETOMIDATO-
MIDAZOLAM EN PERROS Y GATOS**

Marcelo Adrián Priotto

Madrid, 2015

Dña. María Dolores de San Andrés Larrea con DNI 389262X, Profesora Titular de Toxicología y Farmacología y D. Manuel Ignacio de San Andrés Larrea con DNI 5363338Z Profesor Titular de Farmacología, adscritos al Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN

Que la memoria presentada por el Médico Veterinario D. Marcelo Adrián Priotto, con el título “Estudio cronobiológico de la respuesta farmacológica y la variación de parámetros hemodinámicos de la combinación etomidato-midazolam en perros y gatos”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los campos de prácticas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (Argentina).

Madrid, septiembre de 2015

Fdo. María Dolores de San Andrés Larrea

Fdo. Manuel I.de San Andrés Larrea

Trabajo que presenta D. Marcelo Adrián Priotto
para aspirar al título de Doctor

Fdo. Marcelo Adrián Priotto
Madrid, septiembre de 2015

Agradecimientos

En primer lugar, quiero manifestar mi sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, los profesores Dr. Manuel San Andrés Larrea y Dra. María Dolores San Andrés Larrea, por su orientación y formación académica, científica y profesional en el camino de la Farmacología y de la investigación. Demostrando en todo momento una gran dedicación, paciencia y generosidad en el proceso de formación doctoral. Estableciendo un vínculo de armonía, amistad y compromiso que quiera Dios se mantenga durante muchos años. De ellos he aprendido que la grandeza de las personas está en su esencia, plasmada en sus principios, expresada en los grandes logros pero también, en los pequeños actos cotidianos.

Al Dr. Juan Carlos Boggio, quién me incentivó y apoyó desde un principio, gestionando e impulsando la realización de esta Tesis. Ojalá algún día, con la ayuda de Dios, pueda ver los frutos de su impecable e inolvidable gestión en la Universidad Católica de Córdoba.

A la Universidad Complutense de Madrid, por permitirme desarrollar la carrera de Doctorado en tal prestigiosa institución académica y científica.

Al Dr. José Julio de Lucas Burneo y la Dra. María Victoria Barahona Gomariz por su colaboración en el proyecto y la excelente hospitalidad que me brindaron durante mi estancia en Madrid.

A mi esposa Marcela, por acompañarme, guiarme y apoyarme en esta etapa profesional. Gracias por la paciencia infinita y el incondicional amor diario que me brindas.

A mis compañeros de trabajo de la Universidad Católica de Córdoba: Diego Graiff, Germán Zurbriggen, Matías Lorenzutti, Nicolás Litterio, Carolina Ghersevich, Michel Hick. Sin su colaboración este proyecto no hubiese sido posible.

A mis padres, Carmen y Alberto, por enseñarme que los principales objetivos alcanzados en la vida, se disfrutan mucho más si se obtienen con esfuerzo, trabajo y honestidad. Ellos me educaron y formaron con lo máspreciado de la vida, el amor.

A mi hermana Cecilia, por su apoyo permanente y su ejemplo de tenacidad y esfuerzo para tratar siempre de alcanzar la mejor calidad en la actividad profesional.

A mis compañeros de trabajo de CEMVET, Horacio, Fernanda, Romina y Juan, por seguir “remando el barco” durante mis prolongadas ausencias.

A la Universidad Católica de Córdoba por su apoyo.

A todos mis amigos.

A Laura Graciela,
el sol que ilumina nuestros días.

Abreviaturas

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

ADH: Hormona antidiurética

AIEs: Antiinflamatorios esteroides

AINE: Antiinflamatorios no esteroides

ANOVA: Análisis de la varianza

ASA: Calificación del estado físico del paciente según la Sociedad Norteamericana de Anestesiología

AUC: Área bajo la curva

CBF: Flujo sanguíneo cerebral

C_{max}: Concentración máxima del fármaco

CMRO₂: Metabolismo cerebral

CO₂: Dióxido de carbono

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CYP: Citocromo

DL₅₀ / DH₅₀: Dosis letal/Dosis hipnótica

DL₅₀: Dosis Letal, 50%

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EEG: Electroencefalograma

E_{max}: Desaceleración máxima del borde espectral del electroencefalograma

FC: Frecuencia cardíaca

FSH: Hormona estimulante del folículo

FV: Fibrilación ventricular

GABA: Ácido Gamma Aminobutírico

IC₅₀: 50% de la máxima desaceleración del electroencefalograma

IC₉₀: 90% de la máxima desaceleración del electroencefalograma

IECA: Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina

IFN: Interferón

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleucina

LH: Hormona luteinizante

MESOR: Línea media de estimación estadística del ritmo

MRT: Tiempo de residencia media

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: *Natural killer*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPY: Neuropeptido Y

NSA: Nódulo sinoauricular

NTF: Factores de necrosis tumoral

p Ka: Constante de disociación ácida

PA: Presión arterial

PaCO₂: Presión arterial de dióxido de carbono

PAD: Presión arterial diastólica

PAM: Presión arterial media

PaO₂: Presión arterial de oxígeno

PAS: Presión arterial sistólica

PIC: Presión intracraneal

PK/PD: Farmacocinéticos/Farmacodinámicos

SpO₂: Saturación de oxígeno arterial

t_{1/2} k_{e0}: Tiempo medio de equilibrio entre sangre/cerebro

t_{1/2 α} : Semivida de distribución rápida

t_{1/2 β} : Semivida de distribución lenta

t_{1/2 λ} : Semivida de eliminación

V_e: Volumen inicial de distribución

V_{dc}: Volumen aparente del compartimiento central

V_{dds}: Volumen total aparente de distribución

Índice

I.- Resumen.....	1
I.1.- Resumen	3
I.2.- Summary.....	5
II.- Introducción e importancia del estudio.....	7
II.1.- Cronobiología.....	9
II.1.1.- Homeostasis.....	9
II.1.2.- Ritmos biológicos.....	11
II.1.3.- Ritmo circadiano.....	19
II.1.4.- Variación circadiana de los parámetros hemodinámicos.....	23
II.2.- Cronofarmacología.....	28
II.2.1.- Cronoterapéutica.....	28
II.2.2.- Cronofarmacocinética.....	32
II.2.3.- Cronofarmacodinamia.....	35
II.2.4.- Cronotoxicidad.....	38
II.3.- Agentes anestésicos inyectables.....	39
II.4.- Etomidato.....	41
II.4.1.- Principio activo.....	41
II.4.2.- Usos y mecanismo de acción.....	42
II.4.3.- Farmacocinética.....	44
II.4.4.- Efectos farmacológicos sobre órganos y sistemas.....	45
II.4.4.1.- Sistema cardiovascular.....	45
II.4.4.2.- Sistema nervioso central.....	49
II.4.4.3.- Sistema respiratorio.....	50
II.4.4.4.- Sistema endócrino.....	51
II.4.4.5.- Sistema muscular.....	52
II.4.4.6.- Otros.....	53
II.5.- Midazolam.....	54
II.5.1.- Principio activo.....	54
II.5.2.- Usos y mecanismo de acción.....	55
II.5.3.- Farmacocinética.....	57
II.5.4.- Efectos farmacológicos sobre órganos y sistemas.....	61
II.5.4.1.- Sistema cardiovascular.....	61
II.5.4.2.- Sistema respiratorio.....	61
II.5.4.3.- Sistema nervioso central.....	62
III.- Objetivos e Hipótesis.....	65
III.1.- Objetivo general.....	67
III.2.- Objetivos particulares.....	67
III.3.- Hipótesis.....	67
IV.- Materiales y métodos.....	69
IV.1.- Materiales.....	71
IV.1.1.- Animales.....	71
IV.1.2.- Fármacos utilizados.....	72
IV.1.3.- Materiales utilizados durante la administración de los fármacos.....	72
IV.1.4.- Equipos utilizados en la evaluación de los parámetros hemodinámicos.....	72
IV.1.5.- Instrumentación para el análisis de los datos.....	72
IV.2.- Métodos.....	73

IV.2.1.-Acondicionamiento y mantenimiento de los animales	73
IV.2.2.- Criterios de inclusión.....	73
IV.2.2.1.- Examen físico general.....	74
IV.2.2.2.- Analítica sanguínea.....	74
IV.2.2.2.1.- Análisis hematológicos.....	74
IV.2.2.2.2.- Bioquímica sanguínea.....	74
IV.2.3.- Diseño de la experiencia.....	75
IV.2.4.- Protocolo anestésico.....	76
IV.2.5.- Observación de la respuesta farmacológica.....	76
IV.2.6.- Registro de parámetros hemodinámicos.....	76
IV.2.7.- Criterios de exclusión.....	77
IV.2.8.- Tratamiento estadístico.....	77
V.- Resultados.....	79
V.1.- Gatas.....	81
V.1.1.- Examen clínico y analítica sanguínea de las gatas.....	81
V.1.2.- Resultados de los parámetros anestésicos en gatas.....	82
V.1.2.1.- Horarios de invierno.....	82
V.1.2.1.1.- Tiempo de inducción.....	82
V.1.2.1.2.- Tiempo de inmovilización.....	83
V.1.2.1.3.- Tiempo de recuperación.....	84
V.1.2.1.4.- Tiempo de respuesta total.....	85
V.1.2.2.- Horarios de verano.....	86
V.1.2.2.1.- Tiempo de inducción.....	86
V.1.2.2.2.- Tiempo de inmovilización.....	87
V.1.2.2.3.- Tiempo de recuperación.....	88
V.1.2.2.4.- Tiempo de respuesta total.....	89
V.1.2.3.- Análisis estadísticos de los parámetros anestésicos en gatas entre los horarios de invierno y verano.....	90
V.1.2.3.1.- Tiempo de inducción.....	90
V.1.2.3.2.- Tiempo de inmovilización.....	91
V.1.2.3.3.- Tiempo de recuperación.....	91
V.1.2.3.4.- Tiempo de respuesta total.....	91
V.1.3.- Resultados de los parámetros hemodinámicos en Gatas.....	92
V.1.3.1.- Horarios de invierno.....	92
V.1.3.1.1.- Frecuencia cardíaca.....	92
V.1.3.1.2.- Presión arterial diastólica.....	93
V.1.3.1.3.- Presión arterial media.....	94
V.1.3.1.4.- Presión arterial sistólica.....	95
V.1.3.1.5.- Saturación de oxígeno arterial.....	96
V.1.3.2.- Horarios de verano.....	97
V.1.3.2.1.- Frecuencia cardíaca.....	97
V.1.3.2.2.- Presión arterial diastólica.....	98
V.1.3.2.3.- Presión arterial media.....	99
V.1.3.2.4.- Presión arterial sistólica.....	100

V.1.3.2.5.- Saturación de oxígeno arterial.....	101
V.1.3.3.- Análisis estadísticos de los parámetros hemodinámicos en gatas entre los horarios de invierno y verano.....	102
V.1.3.3.1.- Frecuencia cardíaca.....	102
V.1.3.3.2.- Presión arterial diastólica.....	103
V.1.3.3.3.- Presión arterial media.....	103
V.1.3.3.4.- Presión arterial sistólica.....	104
V.1.3.3.5.- Saturación de oxígeno arterial.....	105
V.2.- Perras.....	106
V.2.1.- Examen clínico y analítica sanguínea de las perras.....	106
V.2.2.- Resultados de los parámetros anestésicos en perras.....	107
V.2.2.1.- Horarios de invierno.....	107
V.2.2.1.1.- Tiempo de inducción.....	107
V.2.2.1.2.- Tiempo de inmovilización.....	108
V.2.2.1.3.- Tiempo de recuperación.....	109
V.2.2.1.4.- Tiempo de respuesta total.....	110
V.2.2.2.- Horarios de verano.....	111
V.2.2.2.1.- Tiempo de inducción.....	111
V.2.2.2.2.- Tiempo de inmovilización.....	112
V.2.2.2.3.- Tiempo de recuperación.....	113
V.2.2.2.4.- Tiempo de respuesta total.....	114
V.2.2.3.- Análisis estadísticos de los parámetros anestésicos en perras entre los horarios de invierno y verano.....	115
V.2.2.3.1.- Tiempo de inducción.....	115
V.2.2.3.2.- Tiempo de inmovilización.....	116
V.2.2.3.3.- Tiempo de recuperación.....	116
V.2.2.3.4.- Tiempo de respuesta total.....	116
V.2.3.- Resultados de los parámetros hemodinámicos en perras.....	117
V.2.3.1.- Horarios de invierno.....	117
V.2.3.1.1.- Frecuencia cardíaca.....	117
V.2.3.1.2.- Presión arterial diastólica.....	118
V.2.3.1.3.- Presión arterial media.....	118
V.2.3.1.4.- Presión arterial sistólica.....	120
V.2.3.1.5.- Saturación de oxígeno arterial.....	121
V.2.3.2.- Horarios de verano.....	122
V.2.3.2.1.- Frecuencia cardíaca.....	122
V.2.3.2.2.- Presión arterial diastólica.....	123
V.2.3.2.3.- Presión arterial media.....	124
V.2.3.2.4.- Presión arterial sistólica.....	125
V.2.3.2.5.- Saturación de oxígeno arterial.....	126

V.2.3.3.- Análisis estadísticos de los parámetros hemodinámicos en perras entre los horarios de invierno y verano.....	127
V.2.3.3.1.- Frecuencia cardíaca.....	127
V.2.3.3.2.- Presión arterial diastólica.....	128
V.2.3.3.3.- Presión arterial media.....	128
V.2.3.3.4.- Presión arterial sistólica.....	129
V.2.3.3.5.- Saturación de oxígeno arterial.....	130
VI.- Discusión.....	131
VI.1- Discusión del material.....	133
VI.1.1.- Material biológico.....	133
VI.2.- Discusión del método.....	134
VI.2.1.- Protocolos y vías de administración.....	134
VI.3.- Discusión de los resultados.....	136
VI.3.1- Parámetros anestésicos en gatas.....	136
VI.3.1.1.- Variaciones circadianas en invierno.....	136
VI.3.1.2.- Variaciones circadianas en verano.....	137
VI.3.1.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano.....	137
VI.3.2.- Parámetros hemodinámicos en gatas.....	138
VI.3.2.1.- Variaciones circadianas en invierno.....	138
VI.3.2.2.- Variaciones circadianas en verano.....	140
VI.3.2.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano.....	144
VI.3.3- Parámetros anestésicos en perras.....	144
VI.3.3.1.- Variaciones circadianas en invierno.....	144
VI.3.3.2.- Variaciones circadianas en verano.....	145
VI.3.3.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano.....	145
VI.3.4.- Parámetros hemodinámicos en perras.....	146
VI.3.4.1.- Variaciones circadianas en invierno.....	146
VI.3.4.2.- Variaciones circadianas en verano.....	148
VI.3.4.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano.....	150
VII.- Conclusiones.....	155
VIII.- Referencias bibliográficas.....	159
IX.- Anexos.....	173

I.- Resumen

I.1.- Resumen

Una doctrina fundamental de la biología, la medicina, la fisiología o la farmacología es la relativa constancia del medio biológico interno (**Homeostasis**). Las variables homeostáticas no se mantienen a un nivel constante, sino dentro de un cierto intervalo de valores repetidos a intervalos regulares (**Ritmos Biológicos**); cuando dicho ciclo se cumple en un periodo de 24 h se denomina **Ritmo Circadiano**. Los sincronizadores que definen este ritmo son, entre otros, la alternancia luz-oscuridad o la rutina de sueño (descanso-actividad).

La **Cronobiología** estudia los ritmos biológicos y sus mecanismos de cronometraje, determinando la influencia que los mismos pueden ejercer en los seres vivos. La **Cronofarmacología**, a su vez, estudia los efectos de los fármacos en función del ritmo circadiano (bien por alteraciones en su cinética: cronofarmacocinética; o en su dinámica: cronofarmacodinamia), determinando el período decisivo de su administración, para conseguir un aumento de su eficacia y/o disminución de sus efectos adversos.

Estas alteraciones son, particularmente, importantes en aquellos grupos farmacológicos más críticos como los anestésicos, ya que existen diferencias en la capacidad anestesia dependientes de la hora del día en que se administran estos fármacos.

El etomidato es un agente anestésico no barbitúrico de acción rápida, recomendado para la inducción anestésica en animales que presentan patologías que comprometen su estabilidad hemodinámica, ya que no provoca alteraciones severas en el sistema cardiovascular o en la presión intracraneal. Actúa facilitando la transmisión mediada por GABA, al interactuar con una zona alostérica del complejo receptor GABA – ionóforo Cl⁻.

Los objetivos de este estudio son la evaluación de la influencia de los ritmos biológicos en el comportamiento farmacodinámico de la combinación anestésica etomidato-midazolam, así como la evaluación de las variaciones hemodinámicas y de la influencia de la cronobiología sobre estas variaciones provocadas por el uso de esta combinación anestésica, en perros y gatos adultos.

Ocho perras y ocho gatas recibieron la combinación de etomidato (3 mg/kg) y midazolam (0,1 mg/kg) por vía endovenosa, en 4 horarios diferentes del día (02, 08, 14, y 20 h), en invierno y verano, con un tratamiento por semana, en un estudio aleatorio de diseño cruzado.

La duración de la respuesta farmacológica se determinó registrando la aparición y duración de los **tiempos de inducción, inmovilización, recuperación y respuesta total anestésica**. Se estudiaron también las variaciones en **frecuencia cardíaca, presión arterial (diastólica, media y sistólica)** y **saturación de oxígeno arterial** durante la etapa anestésica.

Los datos correspondientes fueron analizados por ANOVA de los cuadrados mínimos utilizando un modelo general lineal. El nivel de significación fue de $p \leq 0,05$.

Los resultados obtenidos indican que el comportamiento circadiano del efecto anestésico es similar en perros y en gatos, siendo mayor su duración en los períodos de descanso de los animales (nocturnos en los perros y diurnos en los gatos). En las gatas estudiadas durante el invierno, observamos un aumento en el tiempo de inmovilización ($p=0,028$) con un consecuente aumento en la respuesta total anestésica ($p=0,0113$) en los horarios matinales (acrofases a las 10:27 h y 09:13 h, respectivamente). En las perras, la respuesta total anestésica fue mayor durante los horarios nocturnos ($p=0,0269$ y $p=0,0020$) en invierno y en verano (acrofases a las 06:53 h y 06:13 h, respectivamente). Probablemente, esto fue debido a las menores capacidades metabólicas y/o mayor sensibilidad receptorial gabaérgica durante los horarios de descanso de estas especies.

En los gatos, hubo una diferencia importante en la duración del tiempo anestésico durante el invierno en comparación con el verano, registrándose un significativo aumento de los tiempos de inmovilización ($p=0,0001$), recuperación ($p=0,0107$) y respuesta total anestésica ($p=0,0024$). Esto no sucedió con los perros, en los cuales la duración del efecto anestésico fue similar en las dos estaciones del año.

Con respecto a los parámetros hemodinámicos evaluados se determinó que en los perros, luego de la inducción anestésica, los valores de frecuencia cardíaca (FC), presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y presión arterial sistólica (PAS), fueron menores en verano que en invierno, si bien se mantuvieron dentro de los valores considerados fisiológicos. Estas variaciones no sucedieron en los gatos, cuyos valores de estos parámetros hemodinámicos fueron similares en las dos estaciones del año. La mayoría de las constantes fisiológicas estudiadas exhibieron en ambas especies, durante la **época invernal**, sus acrofases generalmente durante el período de actividad. Las acrofases en gatos de la FC preinducción fueron 5, 10 y 15 min; postinducción fueron a las 06:24 h, 17:00 h, 18:33 h y 20:26 h, respectivamente, y en perros fueron a las 16:56 h, 14:37 h, 11:12 h y 11:23 h, respectivamente. Las PAD, PAM y PAS presentaron, en ambas especies, un comportamiento muy dispar, sobre todo entre los 5 y 15 min frente a los 10 min postinducción. En **verano**, manifestaron una mayor variabilidad circadiana, con acrofases en diferentes períodos (descanso o actividad); en perros la acrofase de la FC preinducción fue a las 03:27 h y en gatos a las 17:00 h. (períodos de descanso en ambas especies). Por tanto, la menor cantidad de horas de luz solar en invierno, la consecuente mayor liberación de melatonina, unido a una menor presión medioambiental ejerció una gran influencia sobre el comportamiento circadiano de los parámetros hemodinámicos en ambas especies.

La combinación anestésica produjo una mayor depresión del sistema respiratorio en perros que en gatos, siendo necesaria en los primeros, un suplemento de oxígeno (O_2) a fin de alcanzar y mantener los niveles fisiológicos de saturación de oxígeno arterial (SpO_2) durante el tiempo anestésico.

Como conclusión, consideramos que las dosis del anestésico se deberían ajustar a la capacidad de cada individuo, considerando críticos los horarios matinales para los gatos en invierno y los horarios nocturnos para los perros en la misma estación, especialmente, en los individuos con alto riesgo anestésico.

VII.2. - Summary

A fundamental doctrine of biology, medicine, physiology and pharmacology is the relative constancy of the internal biological environment (**Homeostasis**). Homeostatic variables are not maintained at a constant level, but within a certain interval repeated at regular intervals (**Biological Rhythms**) values; when the course is accomplished in a period of 24 h is called **Circadian Rhythm**. Synchronizers that define this rate are, among others, the light and darkness or sleep routine (rest-activity).

Chronobiology studies the biological rhythms and timing mechanisms, determining the influence they can have on living things. The **chronopharmacology**, studies the effects of drugs on circadian rhythm function (either by alterations in its kinetics: chronopharmacokinetics, or in its dynamics: chronopharmacodynamics), determining the decisive period for administration, for increased efficiency and/or decrease its adverse effects.

These changes are particularly important in the most critical pharmacological groups such as anesthetics because there are differences in the ability of anesthesia that depend on the time of day when these drugs are administered.

Etomidate is a not barbiturate fast-acting anesthetic agent, recommended for induction of anesthesia in animals with diseases that compromise hemodynamic stability, as it does not cause severe alterations in the cardiovascular system or the intracranial pressure. It acts facilitating GABA-mediated transmission, interacting with an allosteric site of the GABA – ionophore Cl⁻ receptor.

The objectives of this study are to assess the influence of biological rhythms in the pharmacokinetic behavior of the anesthetic etomidate-midazolam combination and evaluation of hemodynamic changes and the influence of chronobiology on these variations caused by the use of this anesthetic combination in adult dogs and cats.

Eight dogs and eight cats received the combination of etomidate (3 mg/kg) and midazolam (0.1 mg/kg) intravenously, in 4 different times of the day (02, 08, 14, and 20 h) in winter and summer, with a weekly treatment, in a randomized crossover design.

The duration of pharmacological response was determined by recording the onset and duration of the **induction times, immobilization times, recovery times and total anesthetic response**. It also studied changes in **heart rate, blood pressure (diastolic, mean and systolic) and arterial oxygen saturation** during the anesthesia.

The data were analyzed by ANOVA using a least squares general linear model. The level of significance was $p \leq 0.05$.

The results showed that the circadian behavior of the anesthetic effect was similar in dogs and cats, with a greater duration in the rest periods (nocturnal in dogs and daily in cats) of the animals. In cats studied during the winter, we saw an increase in downtime ($p=0.028$) with a consequent increase in total anesthetic response ($p=0.0113$), in the morning hours (acrophases at 10:27 h and 09:13 h respectively). In dogs, the total anesthetic response was higher during night hours ($p=0.0269$ and $p=0.0020$) in winter and in summer (acrophases at 06:53 h and 06:13 h

respectively). Probably this occurs due to the lower metabolic and/or gabaergic receptorial greater sensitivity during times of rest for these species.

In cats, there was a significant difference in the duration of anesthesia during the winter compared to summer recording a significant increase in downtime ($p=0.0001$), recovery ($p=0.0107$) and total anesthetic response ($p=0.0024$) during the winter. This did not happen in dogs, in which the duration of the anesthetic effect was similar in the two seasons.

Regarding the evaluated hemodynamic parameters that were determined in dogs, after induction of anesthesia the values of heart rate (HR), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP) and systolic blood pressure (SBP) were lower in summer than in winter, but remained within physiological values. This change did not occur in cats, in which the values of these hemodynamic parameters were similar in the two seasons. Most physiological constants studied, in both species exhibited during the **winter**, their acrophases usually during the activity; the acrophases in cats of HR pre induction, 5, 10 and 15 min after induction were at 06:24 h, 17:00 h, 18:33 h and 20:26 h respectively, in dogs were at 16:56 h, 14:37 h, 11:12 h and 11:23 h respectively. The DBP, MAP and SBP presented in both species, a very different pattern, especially between 5 and 15 min compared with 10 min post induction. In **summer**, they expressed greater circadian variability, with acrophases in different periods (rest or activity); in dogs the acrophase of HR pre induction was at 03:27 h and 17:00 h cats (Rest periods in both species). Therefore, the fewer hours of sunlight in winter, the resulting increased release of melatonin, combined with less environmental pressure exerted a great influence on the circadian behavior of hemodynamic parameters in both species.

The anesthetic combination produced greater respiratory depression in dogs than in cats, being necessary in the first, supplemental oxygen (O_2) to achieve and maintain physiological levels of blood oxygen saturation (SpO_2) during the anesthetic time.

In conclusion, we believe that the anesthetic dose should be adjusted to the capacity of each individual, considering the critical morning hours for cats in winter and night hours for dogs in the same season, especially in individuals with high anesthetic risk.

II.- Introducción

II.1.- Cronobiología

II.1.1.- Homeostasis

Una doctrina fundamental de la biología, la medicina, la fisiología o la farmacología, es la homeostasis, es decir, la relativa constancia del medio biológico interno. El concepto de homeostasis se basa, principalmente, en las investigaciones realizadas por Claude Bernard, en Francia, a finales del siglo XIX y Walter Cannon, en los Estados Unidos, a principios del siglo XX (Smolensky y Peppas, 2007).

El primero articuló la necesidad de mantener un entorno interno estable, el cual le permita a los procesos biológicos proceder, a pesar de las variaciones en el entorno externo. Posteriormente, Cannon acuñó el término "homeostasis" en la descripción de cómo se mantienen las variables fisiológicas claves dentro de un intervalo predefinido, por medio de mecanismos de retroalimentación. Más adelante, Curt Richter amplió el concepto incluyendo a las respuestas de comportamiento como un importante mecanismo por el cual la homeostasis podría ser regulada, además de los sistemas de control interno descritos por Bernard y Cannon. Casi dos décadas después de Cannon, James Hardy propuso un modelo en el que los mecanismos homeostáticos son capaces de mantener las variables fisiológicas dentro de un intervalo aceptable, comparando el valor real de la variable a un valor deseado (Kotas y Medzhitov, 2015).

La teoría de la homeostasis, por la cual un organismo vivo tiende a mantener constantes sus funciones biológicas, provocó un avance extraordinario en la fisiología de los seres vivos. Según este concepto, los organismos superiores han desarrollado a lo largo de su evolución mecanismos de control frente a la variabilidad ambiental. Estos mecanismos permiten la existencia del medio interno, concebido como un sistema endógeno que protege al individuo de las variaciones ambientales y mantiene constantes los parámetros biológicos fundamentales (temperatura corporal, glucemia, niveles sanguíneos de iones, hormonas, etc.). Esta característica de constancia en el medio interno, ha sido considerada como un eslabón muy importante en la evolución biológica y la continuidad de las especies superiores (Betes de Toro, M., 1994).

Es importante distinguir dos tipos de variables existentes en los sistemas homeostáticos: las variables fisiológicas que se mantienen en un nivel estable, tales como la glucosa en sangre o la temperatura corporal central y se llaman *variables reguladas*, frente a las *variables controladas*, que son las actividades de los procesos que contribuyen a la estabilidad de las variables reguladas. Por ejemplo, la concentración de calcio en la sangre es una variable regulada, mientras que la tasa de excreción urinaria de calcio es una variable controlada, la cual es modificada con el fin de regular la concentración de calcio en sangre. Generalmente, son múltiples las variables controladas que contribuyen a la estabilidad de una variable regulada. Por lo tanto, las variables reguladas se refieren a cantidades, mientras que las variables controladas se refieren a los procesos, donde la actividad del proceso es una variable (Kotas y Medzhitov, 2015).

Con el fin de mantenerse dentro de un intervalo deseado, los valores de las variables reguladas deben ser controlados y ajustados continuamente. En consecuencia, todos los sistemas

homeostáticos tienen dos componentes esenciales: controladores y factorías (o fábricas). En la fisiología, los controladores juegan un papel clave en la homeostasis mediante el control de los valores de las variables reguladas. Son típicamente células endocrinas y neuronas sensoriales del sistema nervioso autónomo, el tronco encefálico inferior (médula) y el hipotálamo. Estos controladores monitorizan el valor de la variable regulada (variable fisiológica) y lo compara con el valor de referencia; de manera tal que pueda generar una señal proporcional a esa diferencia (liberan hormonas y neurotransmisores), de esta forma aumentan o disminuyen los flujos creados por las diversas factorías (tejidos y órganos que pueden ajustar estos valores). Por ejemplo, las células B pancreáticas (controlador) producen insulina en respuesta a un aumento de la glucosa en la sangre (variable regulada). La insulina actúa sobre el músculo esquelético, tejido adiposo y el hígado (factorías para aumentar la captación y utilización de glucosa en el músculo y la grasa, además de inhibir la gluconeogénesis en el hígado), reduciendo así el nivel de glucosa en el plasma. Las factorías son definidas por las variables reguladas que mantienen y es sólo relevante con respecto a un circuito homeostático específico. Por tanto los controladores se caracterizan por las variables reguladas que ellos monitorizan, mientras que las factorías se caracterizan por las variables controladas asociadas a las mismas (actividades de los flujos). En ese sentido no son equivalentes los términos "factoría" y "tejido". Todos los tejidos tienen sus propios circuitos homeostáticos que pueden o no estar relacionados con su función como factorías o controladores. Al igual que todos los sistemas homeostáticos, los tejidos tienen sus propias variables reguladas y controladas (Kotas y Medzhitov, 2015).

Las variables homeostáticas no se mantienen a un nivel constante, sino más bien dentro de un cierto intervalo de valores. Algunas variables fisiológicas (por ejemplo, la glucosa en plasma) toleran un intervalo dinámico con valores relativamente amplios, mientras que otros deben permanecer dentro de un intervalo estrecho (por ejemplo, el calcio plasmático). Por otra parte, la misma variable regulada puede tener diferentes intervalos dinámicos aceptables en diferentes tejidos: por ejemplo, el cerebro tiene baja tolerancia a desviaciones en muchas variables fisiológicas (incluyendo oxígeno, glucosa y temperatura), mientras que el tejido adiposo es menos exigente (Kotas y Medzhitov, 2015).

Sin embargo, la comprensión de la biología animal y humana, está basada en gran medida en las conclusiones de las investigaciones llevadas a cabo durante el día y los resultados de estos estudios individuales de hora del día son representativos sólo de una fase del día en particular, es decir, el tiempo biológico durante las 24 horas. Numerosos estudios realizados durante las 24 horas, mensualmente y a lo largo de todo el año, muestran que los resultados de la investigación humana y animal pueden ser muy diferentes según el momento en que son realizados, en relación con el tiempo biológico. Por lo tanto, se deben contemplar, *a priori*, el tiempo durante el día, el mes y el año en los cuales se realizan las investigaciones biológicas, ya que las variaciones que se pueden producir a lo largo del día (a la mañana, a la tarde o a la noche) o de la estación del año (en verano o en invierno) pueden llevar a errores si no se tienen en cuenta estos factores (Smolensky y Peppas, 2007).

II.1.2.- Ritmos biológicos

Está bien establecido que los seres vivos están dotados de relojes biológicos que dirigen todos los procesos de la vida y funciones en todos los niveles de organización (Lemmer, B., 2007). Se denominan **Ritmos Biológicos** a las variaciones de los parámetros biológicos repetidas a intervalos regulares (Piccione y Caola, 2002).

Los parámetros biológicos, incluyendo el comportamiento, funciones fisiológicas y factores bioquímicos sufren fluctuaciones en el organismo vivo. Como hemos dicho, se detectan variaciones en estos parámetros dependiendo del momento en que realiza un ensayo. El rasgo fundamental de estas variaciones es su carácter cíclico, periódico. Los seres vivos, por lo tanto, se mantienen en un continuo movimiento ondulatorio, con tendencia a un valor medio, pero sin llegar nunca al equilibrio estable (Betes de Toro, M., 1994).

El reconocimiento de la importancia del estudio de los ritmos biológicos en las ciencias de la salud se ha incrementado rápidamente en los últimos años. Es sabido que todas las funciones corporales, desde la célula individual al genoma, están organizadas y sincronizadas en el tiempo (Lemmer, B., 2007). Las raíces del estudio de los ritmos biológicos datan del siglo V, cuando Celio Aureliano, basado en el trabajo de Sorano de Éfeso, en el siglo II describe la aparición nocturna de asma. Posteriormente existen informes similares de Wirsung en 1568, de Castello en 1616 y de Floyer en 1698. Sanctorius Sanctorius (1561-1636), profesor de la Universidad de Padua, fue uno de los primeros fisiólogos en realizar auto-experimentos para determinar el ritmo diario de peso corporal relacionado con la transpiración.

Desde los orígenes de la vida todos los organismos se someten a un ritmo cósmico de periodicidad inmutable, el ritmo cosmoclimático, que ha llegado a impregnar el sistema nervioso central de las especies animales. Se trata del ciclo sideral que domina la vida en la Tierra y está formado por la conjunción del ritmo solar (365 días), del ritmo lunar (30 días) y del ritmo terrestre (24 h). Este último es el que determina los llamados ritmos circadianos (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

Los ritmos biológicos y los relojes que los orquestan son los rasgos adaptativos. El entorno ambiental se organiza en el espacio, en términos de su geografía, y en el tiempo. En términos de sus ciclos, los más evidentes son el de 24 horas (circadiano) y las fotoperiodicidades anuales. Estudios ecológicos muestran que la misma geografía expresa una organización temporal bastante precisa. La funcionalidad se optimiza según las diferentes especies: las especies activas diurnamente la utilizan durante el día y especies activas nocturnamente la utilizan durante la noche para propósitos complementarios. La organización del medio interno es como la del entorno ambiental. Está estructurado en el espacio, desde el subcelular a nivel del sistema de órganos que define su anatomía, y en el tiempo con bioperiodicidades que coinciden con las del medio ambiente natural. Los nichos ecológicos del entorno externo muestran diferencias predecibles en el tiempo durante las 24 horas en actividades específicas, y este es también el caso para el entorno endógeno. Todos los procesos biológicos endógenos y las funciones se programan en el tiempo durante las 24 horas para la realización de actividades específicas en momentos determinados (Smolensky y Peppas, 2007).

Un ritmo biológico es una oscilación auto sostenida de origen endógeno. Se define por las características del período, nivel, de amplitud y fase (Smolensky y Peppas, 2007).

El **período** es la duración de tiempo requerido para completar un ciclo único. Tiene una relación inversamente proporcional con la frecuencia, es decir que cuanto mayor es la frecuencia, más corto es el período y a la inversa. El espectro de los ritmos biológicos es amplio. Los ritmos con *período corto* (de más o menos un segundo) son bastante comunes; algunos ejemplos son las oscilaciones de alta frecuencia en los impulsos eléctricos de los sistemas nerviosos central y autónomo, así como las secreciones pulsátiles de alta frecuencia del sistema neuroendocrino. Los ritmos de *período intermedio*, muestran oscilaciones que van desde un par de horas a 6 días, se incluyen en esta categoría el ritmo ultradiano (<20 horas), el ritmo circadiano (~ 24 horas), y el ritmo infradiano (>28 horas a 6 días). Por último, los ritmos de *período largo* muestran oscilaciones de más o menos una semana (circaseptanos), un mes (circamensuales) y de cada estación del año (circanuales) (Smolensky y Peppas, 2007). “Ritmos circanuales ampliamente reconocidos, son los que regulan la estacionalidad reproductiva de diversas especies animales. Entre las domésticas se destacan los caninos y equinos, en los cuales el período reproductivo se induce con el alargamiento de las horas diarias de luz. Por otro lado, los ovinos y los caprinos, presentan una fisiología reproductiva inversa a los caninos, es decir que su fase reproductiva comienza al acortarse la cantidad de horas diarias de luz durante la estación otoño-invernal”.

El **nivel** es la línea base alrededor de la cual se produce la variación rítmica. El nivel de los ritmos circadianos oscila en forma predecible en el tiempo, por ejemplo durante los 21 días de duración del ciclo estral en las vacas y con respecto al año en hombres y mujeres, dando lugar a los ciclos estrales en los bovinos y a los ritmos biológicos anuales de los marcadores bioquímicos específicos de recambio óseo (25-hidroxivitamina D3, 1.25-dihidroxivitamina D3 y hormona paratiroidea) y su relación con la incidencia de fracturas osteoporóticas en pacientes humanos, respectivamente (Woitge y col., 2000; Smolensky y Peppas, 2007).

La **fase** es la sincronización de características específicas, tales como los valores de pico y valle de un ritmo, con relación a una escala de tiempo correspondiente. Por ejemplo, en seres humanos, la fase del ritmo circadiano de alta amplitud de la concentración de cortisol sérico se define por su nivel más alto o *Acrofase* durante la mañana (~ 20 g / dl) alrededor de las 8 a.m. y su punto más bajo o *Batifase* (~0 mg / dl) durante el sueño nocturno (Smolensky y Peppas, 2007).

La **cronobiología** es el estudio de los ritmos biológicos y los mecanismos de cronometraje biológicos. La cronobiología es altamente relevante para los campos de la medicina, y más concretamente para la farmacología y la biodisponibilidad de medicamentos (Smolensky y Peppas, 2007).

La cronobiología nace como ciencia en 1729, cuando el físico francés Jean Jacques d’Ortous de Mairan observó que una planta abría sus hojas durante el día y las cerraba durante la noche. Parecía claro que la planta, simplemente, reaccionaba a la luz solar con algún tipo de movimiento reflejo, pero tuvo la ocurrencia de encerrarla en un armario oscuro y comprobó que

continuaba el mismo movimiento cíclico de apertura y cierre. La planta tenía un reloj biológico endógeno que le permitía reconocer las noches funcionando como un cronómetro (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

El método de evaluación temporal de los sistemas fluctuantes nos da otro punto de vista de un fenómeno, percibiendo en este las variaciones rítmicas que, una vez diferenciadas, nos permiten formular predicciones más precisas y para tomar decisiones fuera de las probabilidades. El estudio de los ritmos biológicos adquiere considerable importancia, ya que se correlaciona con el estado de salud del individuo y de la población como un todo. Los organismos vivos se caracterizan por la variabilidad extrema; de hecho, la mayoría de las variables fisiológicas siguen un patrón rítmico oscilante. La determinación del espectro de frecuencias típicas de los ritmos biológicos ha posibilitado dar una base específica para el concepto dinámico de bienestar. Además, el estudio de la modificación producida en dichos ritmos como resultado de estímulos causados por factores ambientales hace que sea posible estudiar la capacidad de reacción y de adaptación de los individuos al medio ambiente (Piccione y Caola, 2002).

Estudios clínicos demuestran que la magnitud de las diferencias en los ritmos biológicos puede ser tan grande que puede ser un factor determinante en los síntomas y signos de muchas condiciones médicas crónicas. Además, cuando se realiza a un paciente una prueba de diagnóstico o se aplica un tratamiento médico, los ritmos biológicos y los mecanismos de cronometraje biológicos pueden ser un determinante importante del resultado del mismo (Smolensky y Peppas, 2007). Los horarios de muestreo para investigaciones cronobiológicas tienen que considerar el "momento adecuado" (hora de reloj, día de la semana o mes del año) para la recolección de las muestras. Este momento puede variar tanto con la sincronización biológica de los individuos como con el parámetro específico que se desee investigar. Por lo tanto, los investigadores asumen, *a priori*, la mayor o menor importancia sobre el resultado final que puede tener la hora, día, mes y año en que se realizó la investigación (Piccione y Caola, 2002; Smolensky y Peppas, 2007).

La estructura temporal multifrecuencia de los animales, representa un desafío para el muestreo y la interpretación de las mediciones de laboratorio. Sin embargo, también representa una oportunidad para mejorar el valor diagnóstico en las mediciones de muchas variables que muestran ritmos de alta amplitud. La mayoría de los parámetros de laboratorio están sujetos a variaciones rítmicas en diferentes intervalos de frecuencia y en el momento de la toma de muestras y, por ello, la interpretación de los resultados tiene que ajustarse en consecuencia (Piccione y Caola, 2002).

El problema se hace más complejo en animales, por el hecho de que todas las especies se caracterizan por poseer sus propios ritmos biológicos. Ejemplos de esto son las diferencias entre las especies en los ritmos de los ciclos de estro, en los porcentajes de fertilidad y en los índices de vida de los espermatozoides en los distintos momentos del día, así como en los ritmos del tipo cicloide que vemos en las cifras de fertilidad bovina y los de la eclosión de los huevos de gallina en el curso de un año (Piccione y Caola, 2002).

El resultado de una medición obtenida en un tiempo determinado puede, por lo tanto, representar un estado funcional totalmente diferente del organismo animal que un resultado idéntico del mismo parámetro obtenido en otro momento, dependiendo de la etapa de una o más funciones rítmicas en el momento de muestreo. Se pueden desarrollar intervalos de referencia en tiempo cualificado para los individuos evaluados, llamados *cronodesmos*, que se obtienen a través de mediciones repetidas en el mismo individuo durante numerosos períodos. También pueden determinarse para grupos de individuos, a través de mediciones sobre un número limitado de períodos. Por lo tanto, al elaborar un diseño experimental para explorar las funciones rítmicas, éste debe basarse en la mayor cantidad de información cronobiológica que pueda ser obtenida, que a su vez este relacionada con un parámetro dado (Piccione y Caola, 2002).

Para que la curva circadiana presente unas características aceptables, es preciso que los estímulos ambientales la ajusten continuamente. Estos elementos de ajuste se conocen como «dadores de tiempo» o «sincronizadores» (en alemán, *zeitgebers*) que arrastran el ritmo a su posición óptima (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

Los *sincronizadores*, definidos en los años cincuenta por Halberg, son señales externas del medio ambiente, capaces de poner en hora los ritmos biológicos del organismo. En cada especie, se establece una jerarquía de sincronizadores. Para el hombre por ejemplo, el sincronizador más importante es la alternancia luz-oscuridad, la cual define el ritmo circadiano. Un sincronizador social típico para los mamíferos es la presencia o ausencia de la madre en los neonatos. Otros sincronizadores son la alternancia frío-calor que controla los ritmos estacionales, la humedad, el magnetismo terrestre y la alternancia ruido-silencio (Betes de Toro, M., 1994).

El efecto que un sincronizador provoca sobre un ritmo endógeno va a depender del período en el que se aplica el estímulo. Los ritmos endógenos muestran una sensibilidad diferente a los sincronizadores; por ejemplo los pulsos de luz brillante, tienen diferentes efectos sobre los ritmos circadianos de los animales domésticos cuando se aplican en las diferentes etapas del ritmo circadiano. La respuesta de fase para diferentes sincronizadores, la duración de los períodos de funcionamiento libre y el intervalo de períodos durante los cuales pueden aparecer arrastres, varían incluso entre individuos de la misma especie (Piccione y Caola, 2002).

Algunos sincronizadores pueden ser dominantes en sus efectos sobre ciertos ritmos; por ejemplo el tiempo en la captación de comida tiene influencia en el ritmo circadiano de la proliferación celular intestinal, pero no en el número de linfocitos circulantes. La estructura de tiempo, por lo tanto, no es necesariamente la misma en los sujetos que viven bajo diferentes condiciones ambientales y siguiendo diferentes condiciones de cría (Piccione y Caola, 2002).

Cualquier medida de una variable fisiológica se caracteriza por el ensamble de los ritmos de muchas frecuencias que esta función muestra. Estos ritmos son a la vez sujetos a numerosos sincronizadores ambientales. Así, una multitud de factores determinan en cualquier momento dado el estado funcional del parámetro estudiado y la susceptibilidad a agentes ambientales. Por lo tanto, los estímulos externos tienen la capacidad de inducir reacciones en términos de

mecanismos de retroalimentación, que también influyen en los osciladores endógenos. Especialmente en los rumiantes, la ingesta de alimentos generalmente conduce a alteraciones importantes. A causa de los procesos de fermentación microbiana en el rumen, se describe un aumento de temperatura de hasta 1,6 °C. Por otro lado, una gran cantidad de estudios han demostrado que la alimentación también es capaz de actuar como un sincronizador. El estímulo térmico causado por la ingesta de alimentos debe ser capaz de liberar los procesos termorreguladores, pero también podría ser capaz de actuar como un sincronizador (Piccione y Caola, 2002).

Los *osciladores* son estructuras endógenas, relacionadas con los sincronizadores, que regulan y modulan los ritmos biológicos internos. Para el organismo humano, el más importante es el núcleo supraquiasmático, en la base del hipotálamo (Betes de Toro, M., 1994). Dorsal al quiasma óptico y ligeramente lateral al tercer ventrículo. Es una estructura que comprende 16.000 neuronas y glías asociadas (Piccione y Caola, 2002).

El núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior, más la secreción cíclica de melatonina (nocturna) por la epífisis o glándula pineal, conforman el mecanismo de cronometraje central en los mamíferos (Smolensky y Peppas, 2007).

El núcleo supraquiasmático es el sustrato físico del marcapasos circadiano (Piccione y Caola, 2002). El registro de la actividad eléctrica en el núcleo supraquiasmático indica que la mayoría de sus neuronas funcionan como marcapasos (Chassard y Bruguierolle, 2004). Se relaciona con el exterior a través del haz y es el intermediario entre el medio exterior y los ritmos biológicos internos. El núcleo supraquiasmático recibe dos proyecciones fóticas. Los fotorreceptores localizados en la retina proyectan directamente al núcleo supraquiasmático a través del tracto retinohipotalámico. El glutamato es la principal molécula de señalización en esta conexión sináptica. La información fótica también puede llegar indirectamente al núcleo supraquiasmático a través del fascículo intergeniculado, y luego a través del tracto geniculohipotalámico. El Ácido Gamma Aminobutírico (GABA) tipo A y el neuropéptido Y (NPY) actúan como moléculas de señalización en esta conexión sináptica. La actividad aferente serotoninérgica del núcleo del rafe y los NPY-GABA mediados (GABAérgicos) del fascículo intergeniculado participan en estas vías. La acetilcolina, histamina y serotonina están implicados en el control del núcleo supraquiasmático (Chassard y Bruguierolle, 2004).

El núcleo supraquiasmático también está involucrado directamente en la regulación de la sensibilidad de la corteza suprarrenal a la hormona adrenocorticotropina. Se ha propuesto que el núcleo supraquiasmático utiliza vías neuronales autonómicas para difundir el mensaje circadiano a la glándula adrenal (Chassard y Bruguierolle, 2004).

Otros osciladores están situados en la corteza cerebral y en la epífisis. La melatonina, secretada por la epífisis, está relacionada con la sincronización de ciertos sistemas neuroendócrinos en relación con la alternancia luz-oscuridad (Betes de Toro, M., 1994). La síntesis de la melatonina en la epífisis es controlada por el núcleo supraquiasmático. La vía de entrada neuronal para la regulación de la epífisis se origina en la retina, desde aquí se proyecta a

las fibras del núcleo supraquiasmático a través del tracto retinohipotalámico. Desde el núcleo supraquiasmático la señal pasa a través del núcleo paraventricular, sigue el haz medial del cerebro anterior y termina en la columna de células intermediolaterales de la médula espinal torácica superior. A partir de esta, hay una proyección al ganglio cervical superior desde el cual las neuronas simpáticas inervan la epífisis. El transmisor para la epífisis es la noradrenalina, que es inhibida por la luz. La síntesis y liberación de melatonina son, por lo tanto, estimuladas por la oscuridad e inhibidas por la luz. El ritmo diario de melatonina también es controlado por el núcleo supraquiasmático a través de proyecciones GABAérgicas al núcleo paraventricular (Figura II.1.) (Chassard y Bruguierolle, 2004).

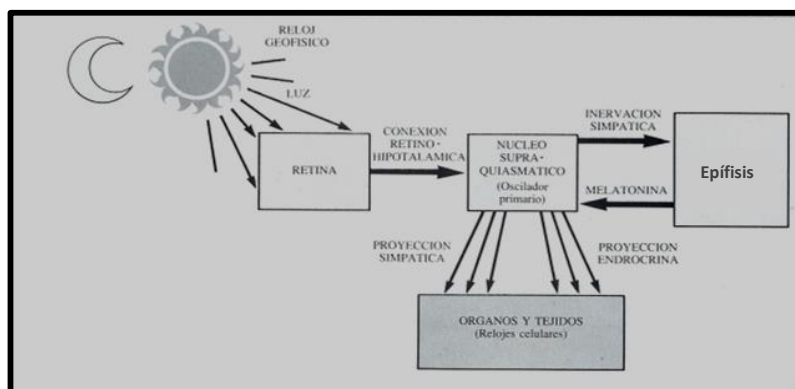


Figura II.1.- Mecanismo de cronometraje central en los mamíferos.

La melatonina se sintetiza a partir de triptófano a través de la hidroxilación por triptófano-5-hidroxilasa a 5-hidroxitriptófano, la descarboxilación por descarboxilasa de aminoácidos aromáticos a 5-hidroxitriptamina (serotonina), la acetilación por N-acetil transferasa a N-acetilserotonina y O-metilación por hidroxindol-O-metiltransferasa a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura II.2). La característica fundamental de esta ruta de síntesis es su ritmicidad. La actividad de la enzima N-acetil transferasa se incrementa entre 30 y 70 veces por la noche y, en la mayoría de circunstancias, es limitante de la velocidad en la síntesis de melatonina (Arendt, J., 1998).

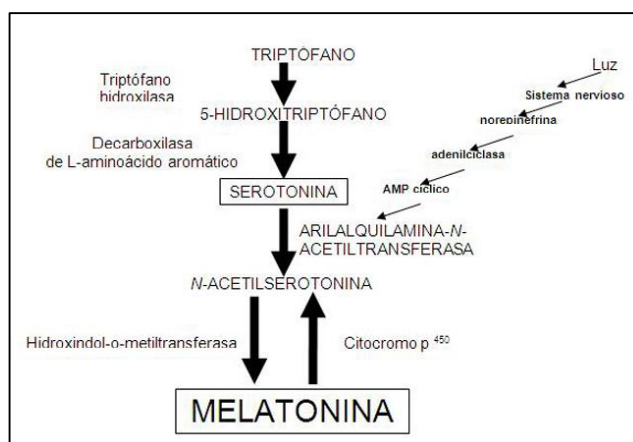


Figura II.2.- Síntesis de melatonina.

Los niveles de melatonina son altos por la noche y bajos durante el día. Por tanto el ritmo diurno de secreción de melatonina no es una respuesta pasiva al ciclo diario luz-oscuridad. La

producción rítmica de melatonina tiene un período de aproximadamente 24 horas, aunque los animales permanezcan en luz u oscuridad constantes; lo que demuestra que es un ritmo endógeno. Dado que la melatonina no es almacenada en grandes cantidades en la epífisis, las concentraciones en sangre reflejan estrechamente tanto la tasa de síntesis como el patrón de secreción (Forsberg, M., 2002).

Esta hormona es clave en la señalización de las estaciones del año en los mamíferos. Una combinación de luminiscencia ambiental percibida por la retina y la función circadiana del núcleo supraquiasmático conducen la producción de melatonina durante la fase oscura. Por lo tanto, la duración de la secreción de melatonina es una representación neuroquímica de la longitud de la noche (Ebling, F.J.P., 2010).

El principal factor ambiental que afecta a la cría de temporada en los mamíferos es la variación anual de la duración del día. El control fotoperiódico de patrones reproductivos está mediado a través de secreciones rítmicas circadianas de melatonina por la epífisis durante la oscuridad. En las especies fotoperiódicas positivas (como el gato y el caballo), la melatonina influye negativamente en la generación de pulsos de la hormona liberadora de gonadotropina y el bucle de retroalimentación hipotálamo-hipofisario-gonadal (Leyva y col., 1989). En los gatos domésticos, dependiendo de la latitud en que se encuentren, pueden existir ciclos de celo durante todo el año, con mayor actividad reproductiva durante los meses en los cuales hay un aumento en la cantidad de horas diarias de luz natural y por lo tanto, menor secreción de melatonina (Faya y col., 2011a), por tanto la melatonina, es reguladora de la actividad ovárica en los gatos domésticos, alcanzando concentraciones máximas durante el anestro y el interestro. Esta hormona se ha estudiado para influir en el control del ciclo estral en esta especie. Su administración oral o parenteral en felinos domésticos produjo la supresión de ciclos del celo, prolongando los intervalos interestros (Faya y col., 2011b).

En las especies fotoperiódicas negativas (como la oveja y la cabra) en cambio, la melatonina influye positivamente en los mecanismos hormonales del ciclo estral (Forsberg, M., 2002).

Estudios en ovejas demuestran que los ciclos reproductivos no relacionados al fotoperíodo ocurrirán aunque los animales fueran ciegos, se los mantuviera en fotoperíodos constantes o fueran sometidos a epifisectomías o extirpaciones del ganglio cervical superior. Es más, los ciclos anuales de actividad reproductiva (ciclos circanuales), que han sido descriptos en varios animales parecen ser generados por un mecanismo endógeno y/o por factores ambientales, implicando que el fotoperíodo no solo induce el comienzo y el final de los eventos reproductivos, sino también sincroniza un ritmo anual endógeno de manera que estos ocurren en el momento apropiado del año (Forsberg, M., 2002). La duración de la secreción de melatonina es por lo tanto, el parámetro crítico en la señalización de la duración del día para la organización de los ritmos estacionales. En ovejas epifisectomizadas, el ciclo de reproducción estacional se desincroniza de 365 días y puede volver a sincronizarse por un solo bloque de 70 días consecutivos de infusiones de melatonina. Por ello, los días largos de primavera son, presumiblemente, necesarios y a la vez suficientes para dar señales de todo el ciclo anual y para

el momento apropiado de desarrollo puberal en ovejas, en ausencia de otras señales de tiempo estacionales (Arendt, J., 1998).

La melatonina tiene efectos “cronobióticos” en el sistema circadiano humano. Ha sido conocido desde principios de 1970 un efecto inductor agudo del sueño y la modificación del electroencefalograma por dosis farmacológicas de melatonina. Dosis bajas de melatonina aumentan la propensión al sueño de una manera dependiente del tiempo, con un aumento de la fatiga subjetiva después de la administración de cantidades fisiológicas de melatonina (<1 mg). Estos avances en el ritmo del sueño son dependientes de la dosis, sobre un intervalo de dosis de 0,05 a 5,0 mg. Así, es posible proponer un papel fisiológico para la epífisis y la melatonina en la organización circadiana de los mamíferos (Arendt, J., 1998).

En los seres humanos, el pico de secreción de melatonina se produce entre las 2 y las 6 de la mañana, con un patrón secretorio en el cual los valores comienzan a aumentar gradualmente a partir del momento de la transición luz/oscuridad, para alcanzar su valor máximo hacia la mitad del período de oscuridad, descendiendo de nuevo a los valores diurnos en la transición oscuridad/luz, sin relación con la fase de sueño (Cardinali y Sánchez-Barceló, 1994). La intensa iluminación artificial (2500 lux) durante los turnos nocturnos reduce la producción de melatonina y su acción protectora sobre el organismo (inducción del sueño, acción antiálgica, protección inmunológica), esto conduce a cambios en el sueño, por lo que otros factores relacionados con la neurotransmisión cronobiológica deben participar en el fracaso de la homeostasis anticipativa (Vale y col., 2009).

La melatonina exógena puede cambiar la fase de los ritmos circadianos, y por lo tanto puede ser utilizada para reducir el grado de desalineación circadiana y atenuar los efectos negativos a la salud que se pueden producir en el *jet lag* (vuelos de larga distancia, cruzando varias zonas horarias), o al trabajar o estudiar durante horarios nocturnos. Diferentes patrones de luz brillante durante la mañana, combinados con una baja dosis de melatonina por la tarde y un avance gradual de sueño en oscuridad pueden hacer avanzar los ritmos circadianos (Crowley y Eastman, 2015).

También se ha informado un uso clínico potencial de la melatonina como sedante. En un estudio realizado con pacientes ginecológicos se demostró que los individuos premedicados, ya sea con melatonina (0,05 mg/kg) o con midazolam (0,2 mg/kg), tuvieron una disminución significativa en la ansiedad y un aumento de la sedación antes de la cirugía. Sin embargo, los pacientes premedicados con midazolam experimentaron un deterioro psicomotor significativo en el período preoperatorio, en comparación con los pacientes premedicados con melatonina, quienes manifestaron ansiolisis preoperatoria y sedación sin deterioro de las habilidades cognitivas y psicomotoras o que afecten a la calidad de la recuperación (Naguib y Samarkandi, 2000).

Estudios realizados en ratas, demostraron que la melatonina produjo una disminución en la presión arterial media, en la frecuencia cardíaca y en la liberación de serotonina, tanto en el cuerpo estriado como en el hipotálamo. Estos resultados sugieren que esta hormona disminuye la

liberación de serotonina en el cerebro y esto resulta en la inhibición simpática o la estimulación parasimpática que conducen a provocar hipotensión y bradicardia (Chuang y col., 1993).

Los **marcapasos** son osciladores primarios, poseen una oscilación auto-sostenida genéticamente determinada, sin señales de tiempo externos, que proporcionan señales de temporización para el organismo y pueden sincronizar una multitud de ritmos en el mismo intervalo de frecuencia (Piccione y Caola, 2002).

El fotoperíodo diario más corto durante el invierno, una fase de retardo de diversos mecanismos conectados a los ritmos circadianos o la entrada de luz subóptima hacia los fotorreceptores de la retina, pueden perturbar la función del núcleo supraquiasmático e interactuar con la epífisis y la secreción de melatonina. El desorden resultante de estas funciones puede afectar la disponibilidad de los neurotransmisores de la vulnerabilidad individual y afectiva, causando el llamado Trastorno Afectivo Estacional de invierno en los seres humanos (Humble, M.B., 2010). Esta patología, se caracteriza por una depresión anual recurrente durante los períodos de otoño-invierno (cuando las horas de luz solar son menores), con una remisión espontánea en primavera-verano, sobre todo en las mujeres. La aplicación de luz brillante artificial, actuando a través de los ojos, mediante la utilización de una caja de luz fluorescente (4.300 lux.) durante aproximadamente 30 min al día, generalmente por la mañana, o el aumento gradual de la luz durante los últimos 30 minutos de sueño, logrando 100 lux antes de despertar (simulación del amanecer), demostraron ser tratamientos eficaces para el Trastorno Afectivo Estacional (Danilenko e Ivanova, 2015).

Es importante destacar que el período sueño-vigilia y los sincronizadores ambientales de los ciclos luz-oscuridad no son el origen o la causa de los ritmos biológicos; sólo sirven como sincronizadores del período y la fase de la base genética endógena, los mecanismos del reloj circadiano y las oscilaciones que conducen. Esta distinción es de importancia crítica en la medicina clínica y la farmacología, por ello la fase de los ritmos circadianos de los individuos cuya organización del tiempo se ajusta a una rutina de actividad nocturna y alterna el trabajo con el sueño diurno será completamente opuesta a la de los individuos cuya organización del tiempo se ajusta a una rutina de trabajo diurno y la actividad se alterna con el sueño nocturno. Esto significa que la hora del reloj, por si sola, no es representativo del tiempo biológico (Smolensky y Peppas, 2007).

II.1.3- Ritmo circadiano

El ritmo circadiano (*circa*: alrededor; *dies*: día), es un ritmo biológico de período intermedio, cuyo ciclo se cumple en un intervalo aproximado de 24 horas. El sincronizador que define este ritmo es la alternancia luz-oscuridad (Betes de Toro, M., 1994).

Al igual que cualquier sistema de cronometraje, el reloj circadiano posee tres componentes: una vía de entrada de ajuste de la hora, un oscilador central de generación de la señal circadiana y una vía de salida que se manifiesta en la fisiología y el comportamiento circadiano. El ciclo diario luz-oscuridad que ocurre en conjunto con la rutina de sueño-vigilia,

establecen los sistemas de marcapasos circadiano en las 24 horas cada día. Los cambios diarios en intensidades de luz se cree que son la principal señal ambiental involucrada en el arrastre circadiano (Ohdo, S., 2007).

En todos los mamíferos estudiados hasta la fecha, ya sea que exhiben actividad nocturna o diurna, la melatonina, como hemos comentado en previamente, sintetizada en la epífisis durante la fase oscura del ciclo luz-oscuridad y entregada rápidamente al torrente sanguíneo se considera que es el mediador utilizado por el reloj endógeno del sistema nervioso central para entregar el mensaje circadiano a las estructuras diana. El efecto de sincronización de la melatonina se produce en un momento circadiano en particular y puede ser diferente según sea una especie con hábitos diurnos o nocturnos (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

Se ha establecido una base genética de los ritmos circadianos, y casi todos los procesos biológicos en las células o en los órganos parecen estar afectados en algún nivel por un reloj circadiano (Chassard y Bruguierolle, 2004).

Los genes de reloj son aquellos genes que controlan los ritmos circadianos. Los genes del reloj (Per1, Per2, Per3, Bmal, Clock, and Cry) son rítmicamente expresados en el sistema nervioso central de los mamíferos. Per1 y Per2 se inducen en respuesta a la luz. En particular, la inducción de Per1 se considera que es un evento inicial en la inducción de la luz, la reposición y el arrastre del reloj biológico circadiano (Ohdo, S., 2007).

Esta red de “reloj maestro” orchestra el período y la fase de la multitud de los relojes circadianos periféricos serviles localizados en células, tejidos y órganos. El efecto final es una organización temporal de los procesos y funciones biológicas. El cronometraje biológico es una adaptación evolutiva a un entorno que se organiza en el tiempo, presentándose fenómenos cíclicos discretos e importantes. De este modo, la organización temporal de los procesos y funciones biológicas durante el período de 24 horas asegura un funcionamiento al máximo de las actividades durante el día y la restauración y reparación durante el descanso nocturno en las especies diurnas (Smolensky y Peppas, 2007).

La aplicación de la cronobiología y de sus conceptos a la biología y a la medicina, dependen de la evaluación cuantitativa de los datos recogidos como una función del tiempo. La inclusión del tiempo como un factor primordial en las investigaciones cronobiológicas amplía el alcance de los métodos de análisis de datos (Smolensky y Peppas, 2007).

Para aplicaciones cronobiológicas, este requisito de muestreo (para ser capaz de reconstruir los cambios como una función del tiempo en el contexto de la teoría de procesamiento de señal) es, a menudo, difícil de cumplir. En cambio, el muestreo se utiliza en su sentido estadístico, donde se refiere a la selección de algunos individuos de una población para sacar conclusiones para esa población (Cornelissen, G., 2014).

Para realizar estudios circadianos es muy importante tener en cuenta los horarios en los cuales se toman los datos. Si se toman dos puntos horarios, aún opuestos, la detección de

diferencias no llega a sustanciar la presencia de un ritmo circadiano, por lo cual sólo se pueden inferir variaciones horarias. La afirmación de la existencia de un ritmo circadiano debe realizarse en base a un número adecuado de muestras (al menos cuatro), obtenidas con intervalos de tiempo apropiados (Rebuelto, M., 2004).

El valor medio de un ritmo idealmente estaría representado por la media de todos los valores instantáneos de la variable oscilante dentro de un período. Sin embargo, en series de tiempo biológico, por ejemplo en la medicina clínica, mediciones cuasi continuas raramente son factibles. El ritmo en estudio se puede aproximar y definirlo por un modelo matemático (Piccione, G. y Caola G., 2002).

Para describir los datos circadianos, Halberg y colaboradores desarrollaron una técnica matemática llamada prueba Cosinor de mínimos cuadrados, la cual involucra un procedimiento analítico que equivale al ajuste de una función cosenoidal de período fijo a los datos por mínimos cuadrados y una representación gráfica de los resultados (Figura II.3) (Guo y Stein, 2003).

Desde un punto de vista estadístico, el análisis Cosinor simplemente investiga si los datos se describen mejor por una curva de coseno que por una línea recta (Piccione y Caola G, 2002).

Tres índices se utilizan para ilustrar las características de un ritmo circadiano particular el **MESOR** (*Midline Estimating Statistic of Rhythm*) o línea media de estimación estadística del ritmo, representa la mitad de valor entre los valores más altos y los más bajos de la variable (Guo y Stein, 2003).

El montaje de un modelo sinusoidal del MESOR será igual a la media aritmética de los datos sólo si los datos se obtuvieron a intervalos iguales a lo largo de todo un ciclo del ritmo (Piccione y Caola G, 2002).

La **amplitud**, la cual representa la medida correspondiente a la mitad de la magnitud del cambio rítmico estimado por el modelo matemático (es decir, la curva de coseno), representa la distancia entre el nivel medio (MESOR) y la acrofase (Guo y Stein, 2003).

La **acrofase**, se puede expresar en grados o en unidades de tiempo (horas, minutos, segundos), es una medida del tiempo correspondiente al valor máximo de la variable. Refleja la sincronización de altos valores globales recurrentes en cada ciclo expresado en grados angulares en relación con un tiempo de referencia ajustado a 0°, donde 360° corresponde a un ciclo de 24 h. La **batifase** es el tiempo correspondiente al valor mínimo de la variable (Cornelissen, G., 2014).

Estos índices permiten la comparación de los ritmos circadianos entre diferentes grupos de pacientes. Ciertos parámetros medidos de forma continua (por ejemplo, la frecuencia cardíaca, la presión arterial o el porcentaje de saturación de oxígeno en la sangre) son por lo

general promediados (por ejemplo, en la hora en la que se realizó el muestreo) antes de la realización de análisis Cosinor (Guo y Stein, 2003).

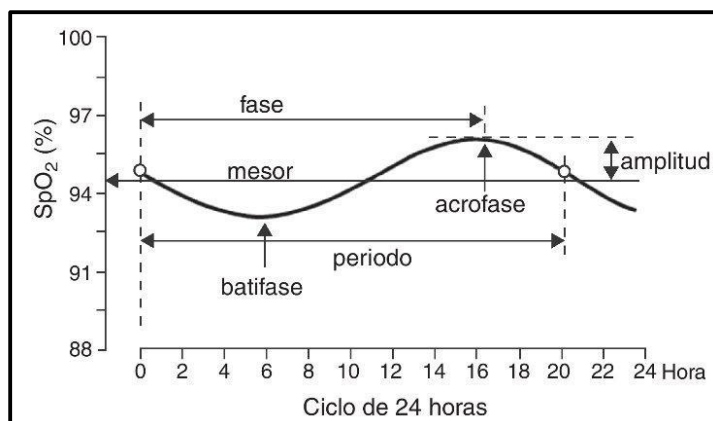


Figura II.3.-: Esquema de la definición de las características del ritmo.

Algunos ritmos biológicos son de muy alta amplitud, representan el 25-50% de la variabilidad total observada en un proceso o función dada durante las 24 horas. La amplitud de los ritmos puede cambiar con el envejecimiento, por ejemplo, en los adultos jóvenes de actividad diurna, el ritmo circadiano de la hormona antidiurética (ADH), la cual regula la formación y el volumen de orina, es de muy alta amplitud. La concentración máxima de ADH se produce durante la noche para asegurar la reducción de la formación y el volumen de orina durante el sueño; por lo tanto, la formación y volumen de orina en adultos jóvenes son mucho mayores durante la actividad diurna que durante la de sueño nocturno. Sin embargo, con el envejecimiento, la amplitud del ritmo de la ADH disminuye; como consecuencia, el pico del ritmo circadiano en la formación y el volumen de la orina se desplaza hacia la mitad de la noche, resultando en alteraciones frecuentes del sueño debido a la necesidad de orinar. La amplitud de ciertos ritmos circadianos también puede variar con el cambio en el estado de salud. Por ejemplo, la amplitud del ritmo circadiano en el calibre de las vías respiratorias de los pulmones normales es bastante pequeña, es igual a aproximadamente el 5% del nivel en 24 horas; sin embargo, en el asma leve se incrementa a un 25%, y en el asma grave se puede aumentar a 50-60% del nivel medio en 24 horas. De este modo, la amplitud y el nivel en 24 horas, que también se redujo notablemente en el ritmo circadiano, a menudo son blancos de la cronoterapia del asma (Smolensky y Peppas, 2007).

También pueden estar implicados ritmos circadianos neuroendocrinos en la mayor gravedad de los síntomas de fase tardía de la rinitis alérgica en pacientes humanos, como lo son la congestión nasal, la obstrucción nasal y la rinorrea; ya que por ejemplo el cortisol, que modula la inflamación del tejido, alcanza la concentración máxima en sangre por la mañana a la hora de iniciar la actividad diaria y se mantiene elevado durante todo el ciclo de vigilia; luego disminuye en la noche y llega a su nivel más bajo de concentración de las 24 horas alrededor de la mitad del periodo de sueño nocturno. Los ritmos circadianos en la adrenalina y la noradrenalina también pueden estar involucrados ya que pueden desempeñar un papel en el control del tráfico de eosinófilos y la estabilidad de sus membranas. El ritmo circadiano en la adrenalina podría

resultar en la liberación diferencial de las sustancias mediadoras pro-inflamatorias durante la 24 horas (Smolensky y col., 2007a).

La rutina de actividad-sueño determina cuando se producen el máximo y el mínimo de varios ritmos circadianos con referencia a la escala de tiempo de 24 horas. La eliminación progresiva de la estructura del tiempo circadiano, a su vez determina cuándo los síntomas de las enfermedades son propensos a estallar, además puede determinar la naturaleza cualitativa y cuantitativa de las respuestas a las pruebas de diagnóstico y las intervenciones terapéuticas de acuerdo a su tiempo. Se infiere además que las intervenciones terapéuticas deben evitar, como un efecto adverso aún no apreciado, la perturbación del sistema de cronometraje circadiano (Smolensky y Peppas, 2007).

La ritmicidad circadiana puede ser perturbada no sólo por factores socio-ambientales como el *jet lag* y la rotación de turnos de trabajo o estudio, sino también por los fármacos que actúan sobre el centro del sistema nervioso, llamados fármacos *cronobióticos*. La anestesia general es un estado en el que se cree se altera el ritmo circadiano. Algunos estudios sugieren que los anestésicos generales perturban el ritmo circadiano en los días siguientes a ser utilizados (Challet y col., 2007).

En un estudio llevado a cabo con hámsteres, algunos fármacos agonistas opioides demostraron tener propiedades cronobióticas, ya que cambiaron significativamente la actividad (rueda para correr) en hámsteres por, aproximadamente, 45 minutos. Inyecciones de morfina provocaron desplazamientos de la fase de actividad y también la hiperactividad inducida, aunque la fase circadiana no se alteró. La restricción de la actividad impidió estos cambios de fase. Estos resultados indican que los agonistas opioides como la morfina, son capaces de producir desplazamientos de fase no lumínica en los ritmos de actividad del hámster y además, pueden afectar independientemente la fase circadiana por sus efectos en el comportamiento, en lugar de por una acción directa sobre el marcapasos circadiano (Byku y Gannon, 2000).

II.1.4.- Variación circadiana de los parámetros hemodinámicos

En cuanto a la variación circadiana de los parámetros hemodinámicos, se han llevado a cabo relativamente pocas investigaciones en los ritmos cardiovasculares en los animales domésticos. La mayoría de los parámetros muestran acrofases diurnas. Sólo el ritmo cardíaco del caballo y algunos parámetros electrocardiográficos en caballos y ovejas muestran picos nocturnos (Piccione y col., 2005).

En el sistema cardiovascular de los animales domésticos, se han descrito patrones rítmicos. En el perro, se ha observado un patrón circadiano en la frecuencia cardíaca, en la presión arterial, en la frecuencia respiratoria, el metabolismo óseo, la disipación de calor y el descanso/actividad. También se han estudiado las variaciones rítmicas en la presión arterial y los parámetros electrocardiográficos en el caballo deportivo. El ejercicio es un sincronizador exógeno que modula la periodicidad del sistema cardiovascular. La variabilidad diurna de los

parámetros cardiovasculares se adapta a las necesidades de las actividades en diferentes niveles, durante los diferentes momentos del día. La frecuencia cardíaca y la presión arterial también varían con los cambios en la actividad, postura y otros estímulos externos. Instrumentos automatizados pueden registrar el curso temporal de tales variaciones, ayudando a establecer valores de referencia para este parámetro y para interpretar su patrón rítmico (Piccione y col., 2005).

En los seres humanos y otras especies diurnas, los parámetros cardiovasculares, tales como la frecuencia cardíaca y la presión arterial, muestran un valor más alto durante el día y los valores más bajos en la noche. Estos cambios diurnos son el resultado de los estímulos externos y los mecanismos endógenos de control homeostático (Piccione y col., 2005). Los valores de hemoglobina y el hematocrito muestran una circadianidad de baja amplitud, con un pico matinal que repercute en la viscosidad sanguínea y en los procesos que se derivan (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

Estudios sobre la organización temporal de algunos parámetros fisiológicos en el caballo, han indicado la existencia de variaciones rítmicas a diferentes frecuencias para algunos parámetros que son índices de funcionalidad, como la frecuencia cardíaca, la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica (Piccione y col., 2005).

El ritmo circadiano de la presión sanguínea humana es ampliamente afectado por la actividad del sistema nervioso autónomo y por las fluctuaciones circadianas de, por ejemplo, los opioides endógenos, el eje hipotálamo-hipofisario, el complejo renina-angiotensina-aldosterona, la función renal y péptidos vasoactivos (Piccione y col., 2005). Además, se han descrito influencias determinadas por factores externos sobre este ritmo, tales como la temperatura ambiental, la actividad física, la posición del cuerpo o el ciclo sueño/actividad (Hermida y col., 2007).

Hace tiempo se conoce de la existencia de un patrón circadiano en la presión arterial sanguínea; fue descrito por primera vez en detalle en la década de los 70 después de la monitorización de la presión sanguínea intraarterial continua en individuos ambulatorios sanos e hipertensos. Estos investigadores reportaron que los niveles de la presión arterial presentan un pico máximo que tiene lugar durante la mitad de la mañana (alrededor de las 10:00 a.m.), a continuación, disminuye progresivamente durante el resto del día para llegar al punto más bajo a la mañana siguiente (alrededor de las 3:00 a.m.). Este aumento de la presión arterial por la mañana, partiendo de niveles bajos durante la noche a niveles más altos durante el día, continúa durante 4 a 6 horas después de despertar. Por lo tanto, las variaciones en la presión arterial, en general, tienden a reflejar el ciclo sueño-actividad (Weber, M. A., 2002). Las observaciones intraarteriales originales han sido validadas por investigaciones que utilizaron una monitorización continua ambulatoria de la presión arterial, revelando un patrón circadiano definido y reproducible en la mayoría de los individuos (Anwar y White, 1998).

Sin embargo, esto es un fenómeno poblacional que tiene que ser individualizado, a los efectos de la individualización, se debe reconocer que el monitoreo de la presión arterial por sólo

24 horas no es suficiente para un diagnóstico fiable y para proporcionar recomendaciones de tratamiento adecuadas y prevenir eventos vasculares adversos; ya que los MESOR circadianos de las presiones arteriales sistólica y diastólica sufren variaciones de un día para otro y el grado de oscilación circadiana también difiere de un día a otro. Además, la presión arterial se caracteriza tanto por una variación circadiana como por una variación circaseptana (~7 días), por lo que la anomalía se puede observar unos días, pero no otros (Otsuka y col., 2000).

Otros autores han monitorizado durante las 24 horas la presión arterial en perros utilizando telemetría y los cambios observados fueron casi idénticos a los descriptos en los seres humanos, con los valores más altos durante los períodos de actividad y la presión arterial más baja durante el sueño. Las personas con turnos de trabajo nocturno, muestran valores elevados de presión arterial en la noche; de manera tal que las fluctuaciones de la presión arterial dependen de dormir, de despertarse y de la actividad que se realiza (Piccione y col., 2005).

En seres humanos, los ritmos de cortisol sérico, la aldosterona, la testosterona, la agregación plaquetaria, la viscosidad de la sangre, y la actividad de las células NK muestran un pico en las primeras horas del día. Los picos de insulina, el colesterol, los triglicéridos, el número de plaquetas y el ácido úrico se producen más tarde durante el día y en la noche. Los ritmos de la secreción de ácido gástrico basal, los linfocitos, prolactina, melatonina, eosinófilos, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) muestran picos en momentos específicos durante la noche (Ohdo, S., 2010).

La secreción de cortisol, como mencionamos anteriormente, se controla en el núcleo supraquiasmático. La concentración basal de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) plasmática es regulada rítmicamente por el núcleo supraquiasmático, dando como resultado un pico de cortisol plasmático en las primeras horas de la mañana, con una concentración mínima alrededor de la medianoche. Al menos dos péptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la vasopresina, modulan la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por parte de la hipófisis anterior (Chassard y Bruguerolle, 2004).

El ritmo circadiano de la frecuencia cardíaca ha sido ampliamente estudiado en los seres humanos. Se ha demostrado que existe un aumento de la frecuencia cardíaca poco después de despertar y comenzar la actividad. La frecuencia cardíaca alcanza su valor máximo (acrofase) entre las 10 y las 12 a.m., luego comienza a declinar gradualmente (aunque algunos estudios han encontrado un segundo pico más débil, en la tarde) y mantiene un nivel inferior durante toda la noche (Guo y Stein, 2003).

Además de la frecuencia cardíaca y la presión arterial, muchos otros parámetros cardiovasculares como el tono vascular, el gasto cardíaco e incluso los índices hemostático-fibrinolíticos también tienen ritmos circadianos. La invención de herramientas para el monitoreo continuo (por ejemplo la electrocardiografía Holter y los registradores de presión arterial ambulatoria), así como los diferentes métodos matemáticos y estadísticos (como la prueba Cosinor por mínimos cuadrados, etc.) posibilitan una mayor caracterización de estos ritmos (Guo y Stein, 2003).

Ahora se cree que el carácter circadiano de la actividad del sistema nervioso autónomo, que persiste incluso en ausencia de la actividad física, determina el ritmo diurno de la mayoría de los parámetros cardiovasculares. Muchos investigadores han informado que la función neural autonómica muestra un ritmo circadiano diferente, con actividad simpática aumentada significativamente durante el día y disminuida durante la noche y la actividad parasimpática disminuida durante el día y aumentada durante la noche. Estos cambios le permiten al organismo adaptarse a las necesidades de mayores niveles de actividad mientras esté despierto (Guo y Stein, 2003).

Los ritmos biológicos no sólo afectan las funciones fisiológicas, sino también la fisiopatología de las enfermedades. Los ataques de epilepsia por ejemplo, son comunes alrededor de la aparición del sueño en la noche y el desplazamiento de la mañana. El riesgo de un ataque de asma es mayor durante la noche. Los síntomas de la artritis reumatoide son peores a primera hora de la mañana, mientras que los de la artrosis son más marcados al atardecer. El dolor y el malestar gástrico experimentados en el inicio de la enfermedad de úlcera péptica y su exacerbación aguda, se relacionan con el pico de secreción de ácido gástrico, son más frecuentes tarde en la noche y temprano en la mañana (Ohdo, S., 2010). También se observa que las recidivas ulcerosas son más frecuentes en primavera (ritmo cronopatológico circanual). Dado que la hipersecreción gástrica y el reflujo esofágico se producen sobre todo de madrugada, en caso de recomendar un inhibidor de la bomba de protones, conviene tomar la dosis diaria por la noche (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

El ritmo circadiano y ultradiano de la glucemia hace que la insulina deba sincronizarse con las horas de actividad y reposo, con menos necesidad por la noche y más por la mañana (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

Históricamente, se creía que en los seres humanos había un ocurrencia aleatoria de infartos agudos de miocardio, accidentes cerebrovasculares, arritmias y otros eventos cardíacos durante las 24 horas del día. Sin embargo, a finales de 1980, una serie de estudios demostraron que casi todos los eventos cardiovasculares exhiben una pronunciada influencia del ritmo circadiano, con frecuencias más altas en la mañana, cuando los pacientes se despiertan, reanudan la postura erguida y comienzan las actividades, y un riesgo relativamente menor durante el sueño. Este hallazgo implica que los posibles mecanismos para eventos cardiovasculares involucran tanto factores endógenos (como la variabilidad circadiana en las funciones del sistema nervioso autónomo, de la concentración de catecolaminas en sangre, la coagulabilidad y capacidad de respuesta posiblemente exagerada, durante la mañana, de los órganos diana a la noradrenalina) como influencias exógenas, es decir, ciclos de reposo-actividad, eventos estresantes, y los cambios posturales (Guo y Stein, 2003).

Aunque aún no ha sido establecido un enlace directo, sin embargo, se puede postular que el aumento en la presión arterial durante la madrugada puede también ser un factor determinante de la precipitación de episodios cardiovasculares agudos y la variabilidad de la presión arterial es un factor determinante de daño a órganos diana entre los pacientes con hipertensión. (Weber, M. A., 2002).

Un área reciente de investigación, involucra al reloj circadiano de los cardiomiocitos y su papel en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Las conclusiones sobre modelos de roedores implican al reloj circadiano de los cardiomiocitos en la regulación diferencial, durante las 24 horas, del metabolismo cardíaco, la función contráctil y la relación entre la reperusión y la tolerancia a la isquemia. Lo que sugiere su papel en la patogénesis de la enfermedad isquémica del corazón y arritmias cardíacas. Modelos en roedores sugieren que una mayor perturbación (desincronización) de este reloj circadiano da lugar a una disfunción cardiovascular (Portaluppi y col. 2012).

Se han observado también, variaciones circadianas en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria, las cuales parecen jugar un papel directo en los cambios temporales que ocurren en la respuesta del organismo a las infecciones. De hecho, se han reportado variaciones circadianas en los niveles plasmáticos de IgA, IgG, IgM, IgE y en diferentes poblaciones de linfocitos T totales, T helper, y T killer, así como en linfocitos polimorfonucleares (Beauchamp y Labrecque, 2007).

Como un componente importante de la homeostasis de energía, la concentración de lípidos en el plasma se mantiene dentro de un intervalo estrecho y exhibe un ritmo circadiano en los mamíferos. Se han encontrado varias moléculas que participan en la regulación de este proceso. Estudios realizados con ratones, demostraron que existe un vínculo molecular entre la fisiología circadiana y el metabolismo de los lípidos plasmáticos, principalmente por la regulación de la expresión de las enzimas hepáticas en el nivel transcripcional. La modulación circadiana de la señalización en el nivel transcripcional está implicada en el metabolismo del colesterol y otros lípidos (Wang y col., 2014).

La glucosa, los ácidos biliares, los lípidos y el colesterol están sujetos al control circadiano. Los ácidos biliares, mediadores en la absorción de grasas en la dieta, nutrientes y vitaminas, se sintetizan a partir del colesterol exclusivamente en el hígado y se almacenan en la vesícula biliar hasta que son liberados después de la ingesta de alimentos. La síntesis de los ácidos biliares representa la mayor parte del catabolismo del colesterol en los seres humanos y está bajo estricta regulación circadiana. En roedores, también presenta un ritmo circadiano bien documentado con un pico temprano en la fase oscura, cuando este tipo de animales están activos. La estricta regulación del metabolismo hepático a través de la regulación circadiana de las vías hepatobiliares juega un papel importante en mantener una máxima eficiencia en el uso y el almacenamiento de nutrientes. El gen de reloj *Rev-erb α* demostró tener un papel importante como mediador circadiano no sólo de los ácidos biliares, sino también del metabolismo de los lípidos y de la glucosa en el hígado (Ferrell y Chiang, 2015).

II.2.- Cronofarmacología

Los ritmos biológicos no sólo impactan en la fisiopatología de las enfermedades, sino también en la farmacocinética, la farmacodinamia, la eficacia y la toxicidad de los medicamentos (Ohdo, S., 2010).

La farmacología ha incorporado las doctrinas de la homeostasis y ha desarrollado distintas pautas de tratamiento basadas en el modelo de administración continua (dosis e intervalos de tiempos fijos), esto se desarrolló con el objetivo de conseguir niveles plasmáticos constantes de fármacos en el medio interno. Sin embargo, como los parámetros biológicos sufren fluctuaciones en el organismo vivo, mantener concentraciones plasmáticas constantes de los fármacos no garantizan, por sí solos, efectos terapéuticos homogéneos a lo largo de las 24 horas (Betes de Toro, M., 1994).

La **cronofarmacología** estudia los efectos de los fármacos en función del tiempo biológico. Se caracteriza por la incorporación de la variable “*tiempo*”, como parámetro organizador de la actividad biológica. El tiempo más importante en cronofarmacología es el que marca la duración del ritmo circadiano, o sea, el tiempo a lo largo del día y de la noche, período decisivo para determinar la administración de un medicamento, teniendo en cuenta su eficacia y sus efectos adversos (Betes de Toro, M., 1994).

El conocimiento del ritmo circadiano en el riesgo de las enfermedades, además de la evidencia de la dependencia del ritmo circadiano en la farmacocinética, farmacodinamia, los efectos y la seguridad de los fármacos, constituyen el fundamento de la cronoterapéutica. Un enfoque para aumentar la eficacia de la farmacoterapia es la administración de medicamentos en horas en las cuales sean más eficaces y mejor tolerados (Ohdo, S., 2010).

II.2.1.- Cronoterapéutica

El empirismo clínico, antes de la “medicina científica” del siglo XIX, ya había manifestado la conveniencia de administrar un fármaco a una hora concreta del día. Para entonces ya se reconocía la influencia del ciclo hormonal femenino en la respuesta a ciertas medicaciones y se recomendaba tomar las píldoras por la mañana o por la noche al efecto de conseguir el máximo beneficio (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

La **cronoterapéutica** es la entrega deliberada de medicamentos en cantidades desiguales en el tiempo, en sincronía con los ritmos biológicos endógenos en la fisiopatología de los distintos estadios de las enfermedades, con el fin de optimizar los resultados de los tratamientos y minimizar o evitar los efectos adversos problemáticos y/o limitantes de las dosis. (Smolensky y col., 2007a). Por ejemplo, los antiinflamatorios esteroides (AIEs), son agentes utilizados ampliamente como antiinflamatorios en diversos tipos de patologías de humanos y animales. Lamentablemente, además de esta acción terapéutica, los AIEs tienen una serie de efectos colaterales entre los que se destaca la capacidad de inhibir la secreción natural de cortisol, es

decir, de producir una insuficiencia suprarrenal. El esquema cronofarmacológico trata de imitar la producción endógena de dicha hormona, con lo cual se evita la retroalimentación negativa sobre su producción. En personas la acrofase de la secreción del cortisol se produce muy próximamente luego del despertar natural; por tanto, la terapéutica debe realizarse administrando la mayor parte de la dosis en horas de la mañana o antes del mediodía (Reinberg y col., 1986).

La cronoterapéutica tiene en cuenta los factores determinantes del ritmo en cuanto a la fisiopatología de la enfermedad (cronopatología), la cronofarmacología (cronofarmacocinética, cronofarmacodinamia y cronotoxicidad) de los medicamentos y los atributos (período, fase, amplitud y nivel) de la estructura del tiempo circadiano, con el fin de determinar el patrón de distribución del fármaco, la dosis y el tiempo de administración (Smolensky y Peppas., 2007).

Los lugares de acción de los fármacos (receptores, membranas celulares, etc.) presentan una sensibilidad variable en función del ritmo circadiano de estas estructuras, en consecuencia, las características farmacodinámicas de un receptor dependerán de la fase en la que se encuentra dentro de su ritmo de actividad (Betes de Toro, M., 1994; Smolensky y Peppas, 2007).

Hay que tener en cuenta, que las funciones corporales están organizados en el tiempo y que las enfermedades pueden modificar, alterar, o incluso abolir ritmos fisiológicos. Además, se debe ser consciente de la creciente evidencia de que los ritmos corporales pueden afectar la disposición de los medicamentos de manera tal que la cinética, la dinámica y la eficacia de los medicamentos no tienen por qué ser las mismas cuando los medicamentos son ingeridos, inyectados, infundidos, inhalados o aplicados por otras vías, en diferentes momentos durante las 24 h, y en algunos casos incluso durante las diferentes estaciones del año (Lemmer, B., 2007).

Hay determinadas situaciones en las cuales es importante estudiar estas variaciones cronocinéticas, especialmente en medicamentos que tienen un estrecho margen terapéutico o en el tratamiento de enfermedades cuya sintomatología posee cambios cronobiológicos intensos, como el asma nocturno, la hipertensión, la angina de pecho, las úlceras duodenales y gastrointestinales, los síndromes inflamatorios, etc. En estos casos el momento en el que se administra un fármaco es un factor de variación adicional a considerar (Bruguerolle, B., 1998).

Ciertas variables que influyen en la farmacocinética como el ayuno, las comidas y las horas de comida, la formulación galénica, la postura, los períodos de actividad y descanso, tienen que ser controlados de acuerdo con el objetivo de la investigación. El objetivo principal de los estudios cronocinéticos es controlar los tiempos de administración de los fármacos que, entre otros, pueden ser responsables de las variaciones en la cinética de los fármacos y además, pueden explicar los efectos cronofarmacológicos observados con ciertos medicamentos (Bruguerolle y Lemmer, 1993).

La respuesta del organismo ante un fármaco va a depender de la fase en la que se encuentre, es decir, el momento en el que se encuentra el organismo en relación con el ritmo biológico. Por otra parte, el fármaco va a modificar su farmacocinética y farmacodinamia según

la fase en la que esté el organismo. Estos fenómenos afectan, en la práctica, a todos los grupos farmacológicos (Betes de Toro, M., 1994).

Es interesante notar que los médicos han estado preocupados durante muchos siglos por la relación entre los ritmos biológicos y los medicamentos; por ejemplo, lo expresado en 1796 por J.C. Reil quien afirmó "haríamos mucho bien si llevásemos los cambios en el cuerpo, en armonía con el horario y la dosis de los fármacos" (Lemmer, B., 2007).

Las recomendaciones relacionadas con los actos asistenciales (cronobiología médica) son interesantes porque suponen un valor añadido de eficacia, traducido en mejoras en el tratamiento del paciente y que no suponen ningún coste adicional (Martínez-Carpio y Corominas, 2004).

Se debe tener en cuenta la elección de cuándo administrar los medicamentos en relación a las influencias del ritmo en su farmacocinética, efecto-duración, eficacia, efectos adversos y resultados beneficiosos. La relación dosis-respuesta ha sido demostrado que dependerá del tiempo de la aplicación del fármaco. En condiciones médicas muy agresivas, el momento circadiano de la medicación, puede desempeñar un papel importante en la supervivencia del paciente (Lemmer, B., 2007). El metabolismo y la excreción son, probablemente, los procesos más afectados por el ritmo circadiano (Cadorniga Carro, R., 1990; Reinberg, A. E., 1992).

La cronoterapia es especialmente relevante en casos en que el riesgo y/o la intensidad de los síntomas de la enfermedad varían predeciblemente en el tiempo, por ejemplo en la rinitis alérgica, artritis, asma, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, accidente cerebrovascular, enfermedad de úlcera péptica y ciertos tipos de cáncer en seres humanos (Ohdo, S., 2010).

La variabilidad intraindividual y la variabilidad interindividual deben considerarse para apuntar a una mejora adicional de la farmacoterapia racional, debido a que muchos medicamentos varían en potencia o toxicidad asociado con la ritmicidad de los procesos bioquímicos, se ha argumentado que la administración de fármacos en ciertas horas del día debe mejorar el resultado de la farmacoterapia (Ohdo, S., 2007).

Los mecanismos de estas variaciones circadianas son probablemente multifactoriales. En la rata (especie con hábitos nocturnos), se ha informado de una variación circadiana en el número y actividad de los receptores de benzodiazepinas, con un número más alto durante el período de descanso. Esto se demostró al administrar diazepam intraperitoneal, resultando ser más tóxico durante la fase de luz del ciclo (fase de descanso) que durante la fase oscura (fase de actividad en esta especie) (Chassard y Bruguerolle, 2004).

El sistema de cronometraje circadiano controla el ciclo celular, la apoptosis, la bioactivación de fármacos, los mecanismos de transporte y de desintoxicación en los tejidos sanos en los tratamientos contra el cáncer. Como consecuencia, la tolerabilidad de la quimioterapia contra el cáncer varía en función del tiempo circadiano en que son administrados los fármacos. Una mejor eficacia antitumoral de un solo agente o de una quimioterapia de

combinación, por lo general corresponde a la administración de medicamentos cerca de sus respectivos tiempos de mejor tolerabilidad. Los modelos estudiados revelan que tales coincidencias entre cronotolerancia y cronoeficacia se explican mejor por las diferencias en la dinámica circadiana del ciclo celular de las células huésped, especialmente con respecto al arrastre circadiano y la variabilidad del ciclo celular. En la clínica, una gran mejora en la tolerabilidad se demostró en ensayos aleatorizados, en los cuales los pacientes con cáncer reciben en el mismo horario una cronoterapia sinusoidal durante las 24 horas, en comparación con la infusión a velocidad constante. Por lo tanto, la administración de fármacos basado en modelos circadianos personalizados, utilizando tecnologías de administración de fármacos y biomarcadores circadianos, mejora la tolerabilidad y la eficacia de los fármacos en los tratamientos contra el cáncer, (Ortiz-Tudela y col., 2013).

Al optimizar el programa de dosificación, se obtiene una eficacia en la potencia terapéutica de los fármacos (Ohdo, S., 2010). Un medicamento que resulta ser terapéutico y seguro, cuando se usa en un determinado tiempo biológico posiblemente podría carecer de eficacia y no ser seguro cuando se usa en otro tiempo biológico. Este fenómeno se manifiesta como se mencionó por ejemplo, en los glucocorticoides sintéticos (AIEs), como la metilprednisolona, la triamcinolona y la prednisolona. Ejercen fuerte efecto antiinflamatorio cuando se ingieren o se inyectan en la mañana o la tarde, pero no en la noche, cuando además, el riesgo de sus efectos adversos es mucho mayor (Smolensky y Peppas, 2007).

La aplicación del ritmo biológico a la farmacoterapia se puede lograr mediante la sincronización apropiada de tabletas y cápsulas formuladas convencionalmente, y sistemas especiales de administración de fármacos para sincronizar las concentraciones de los mismos a los ritmos de actividad de la enfermedad. Las empresas farmacéuticas se han centrado en la investigación de los mecanismos subyacentes, así como la realización de estudios clínicos multicéntricos que implican numerosos pacientes, con el fin de idear intervenciones cronoterapéuticas con una variedad de medicamentos. Nuevas tecnologías para la administración de medicamentos, precisamente, de una forma modulada en el tiempo por medio de bombas nocturnas o ambulatorias está siendo desarrollado para tratar enfermedades humanas (Ohdo, S., 2010).

La cronofarmacología es la ciencia de investigación que aclara las dependencias del ritmo biológico de los medicamentos (Ohdo, S., 2010).

La cronofarmacocinética, la cronofarmacodinamia (cronoestesia), la cronoeficacia y la cronotoxicidad, proporcionan las bases racionales a la cronoterapia, que tiene por objeto establecer las pautas posológicas adecuadas a los ritmos biológicos, a fin de aprovechar al máximo los efectos deseados y reducir los adversos (Reinberg, A. E., 1992).

II.2.2.- Cronofarmacocinética

La *cronofarmacocinética* o *cronocinética*, estudia los cambios rítmicos en la biodisponibilidad, distribución, metabolismo y excreción de fármacos por el organismo en función del momento del ciclo biológico en que se hace la administración (Boggio y col., 1998).

Existen variaciones circadianas en la concentración de un fármaco y sus metabolitos en los líquidos biológicos (plasma, orina, líquido céfalo raquídeo, etc.), aún en administraciones endovenosas continuas. Estas fluctuaciones se deben a que la actividad biológica de las células del organismo es variable a lo largo del día, ya que los sistemas enzimáticos encargados del metabolismo de los fármacos, siguen ritmos de actividad de tipo circadiano, y esa diferente actividad modifica los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco (Betes de Toro, M., 1994).

Se conocen diferencias en la farmacocinética de muchas clases de medicamentos en el hombre y en los animales, algunos ejemplos son los fármacos activos cardiovasculares (bloqueadores beta, antagonistas del calcio, inhibidores de la ECA, nitratos orgánicos, glucósidos, etc.), antiasmáticos (teofilina, beta-agonistas, antagonistas de los leucotrienos, glucocorticoides, etc.), agentes anticancerígenos (5-FU, metotrexato, 6-mercaptopurina, los análogos de platino, doxorubicina, etc.), además de opiáceos, AINE, anestésicos locales, antagonistas H₁ y H₂ de la histamina, inhibidores de la bomba de proteínas, antidepresivos, y otros fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central (Lemmer, B., 2007). Así, la relación dosis-respuesta parece ser dependiente de la fase circadiana (Piccione y col., 2005).

En ovejas se investigó el comportamiento cronofarmacocinético de la indometacina administrada por vía endovenosa. En dicho trabajo se determinó que el fármaco administrado a las 14:00 y 02:00 h tenía un tiempo de semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) mucho menor que cuando se administraba a las 8:00 o 20:00 h. También se pudo establecer que el área bajo la curva (AUC), un parámetro estimativo de la biodisponibilidad de un fármaco, alcanza un valor máximo cuando ésta se inyecta a las 14:00 h, y un mínimo cuando se aplica a las 2:00 h (Boggio y col., 2001).

Los cambios circadianos en la farmacocinética de los AINE se relacionan, principalmente, con alteraciones en la distribución del fármaco. En la rata, las concentraciones plasmáticas iniciales y el área bajo la curva fueron significativamente inferiores en la fase de reposo, en donde el volumen de distribución y el aclaramiento metabólico total fueron superiores a los observados durante la fase de actividad. La absorción fue mejor durante la mañana que durante la noche, posiblemente por un mayor flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal en la mañana (Chassard y Bruguerolle, 2004).

Un estudio cronofarmacocinético realizado en conejos con acetato de ciproterona, demostró que varios parámetros cinéticos presentaban variaciones cronobiológicas notables, en especial el volumen de distribución, el aclaramiento y el área bajo la curva (Boggio y col., 1998).

Muchos antimicrobianos también presentan variaciones cronofarmacocinéticas, la gentamicina en caninos, presenta mayor biodisponibilidad en las horas matutinas, con un mayor volumen de distribución y aclaramiento al atardecer (Widenhorn y col. 2005).

Se han demostrado cambios circadianos durante la absorción de varios fármacos en los seres humanos administrados por vía oral. La secreción de ácido gástrico, el pH, la motilidad, el tiempo de vaciado gástrico y el flujo sanguíneo gastrointestinal varían de acuerdo a la hora del día. Tales cambios pueden contribuir a la diferencia dependiente del tiempo de dosificación, en la absorción del fármaco. Por ejemplo, los cambios circadianos en el pH pueden inducir modificaciones de ionización del fármaco de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas. Para aclarar la función de vaciado gástrico en la absorción del fármaco, se compararon las tasas de vaciado gástrico por la mañana (08:00 h) y por la noche (20:00 h) en 16 hombres sanos, los tiempos medios de vaciamiento gástrico para la comida de la noche fueron significativamente más largos para los sólidos, pero no para los líquidos, en comparación con los de la comida de la mañana. El aumento en el tiempo del vaciado gástrico de la comida en la noche, puede explicar el retraso alcanzando en las concentraciones plasmáticas máximas documentadas para varios fármacos durante los horarios nocturnos (Ohdo, S., 2010).

La diferencia de tiempo, dependiente de la dosis, en la absorción de los fármacos, también está influenciada por las propiedades fisicoquímicas de un fármaco (lipofilia o hidrofilia). Los cambios circadianos en la absorción de un fármaco son significativos para fármacos lipófilos, mientras que no se han demostrado cambios circadianos significativos para fármacos hidrófilos. Tales variaciones pueden estar relacionadas con las propiedades fisicoquímicas, ya que la mayoría de los fármacos lipófilos parecen ser absorbidos más rápidamente en la mañana, en comparación con la noche. Por el contrario, los procesos de absorción de medicamentos altamente solubles en agua no cambian dependiendo del tiempo de dosificación (Ohdo, S., 2010).

La absorción del fármaco por una vía de administración que no sea la oral también está influenciada por los ritmos biológicos. Por ejemplo, la permeabilidad de la piel muestra diferencias dependientes del tiempo circadiano en la absorción de fármacos. La variación temporal en la permeabilidad de la piel a ciertos fármacos ha sido demostrada en niños y en ratas para agentes de anestesia local como procaína y lidocaína. Siendo la penetración más alta por la tarde para los niños y por la mañana para las ratas (Bruguerolle y col., 1991). Estos fenómenos se deben considerar en la penetración específica de fármacos a través de la piel utilizando parches, ya que los dispositivos transdérmicos se aplican las 24 horas del día (Ohdo, S., 2010).

Los cambios circadianos en la permeabilidad de la membrana y el acceso a los canales pueden explicar en parte los cambios temporales en la eficacia de los anestésicos locales. La penetración de lidocaína en eritrocitos de rata mostró variaciones circadianas independientes de las variaciones circadianas de las concentraciones plasmáticas totales. Una variación circadiana de la penetración de los eritrocitos también se demostró para la bupivacaína, etidocaína y mepivacaína, siendo la máxima penetración la que se produce a las 04:00 h para la bupivacaína y a las 10:00 h para etidocaína y mepivacaína. Demostrando que la amplitud más alta del ritmo

circadiano en la penetración de los anestésicos locales en los eritrocitos se observó con el compuesto más lipófilo, la bupivacaína (Chassard y Bruguerolle, 2004).

La absorción ocular de los beta-bloqueantes aplicados tópicamente también se ha demostrado que tiene diferencias dependientes del tiempo circadiano en conejos pigmentados (Ohdo y col., 1991).

Por lo tanto, todos los factores que incluyen la vía de administración, las condiciones de alimentación, la postura y la formulación galénica deben ser considerados, teniendo en cuenta los ritmos biológicos. Los ritmos biológicos a nivel celular y subcelular pueden dar lugar a importantes diferencias de tiempo de dosificación en la farmacodinamia de los medicamentos que no están relacionados con su farmacocinética (Ohdo, S., 2010).

La presencia de ritmos en el número de receptores o su conformación, segundos mensajeros, vías metabólicas, y fracción libre unida de medicamentos ayudan a explicar este fenómeno (Ohdo, S., 2010).

Se documentan cambios circadianos en fluidos biológicos y en los tejidos relacionados con la distribución de los fármacos según el momento del día (Labrecque y Belanger, 1991). El flujo de sangre depende de varios factores reguladores, incluyendo los sistemas simpático y parasimpático, cuyas actividades son conocidas por ser dependientes del tiempo, con un efecto circadiano predominantemente diurno del sistema simpático. Por lo tanto, los aumentos diurnos y descensos nocturnos en el flujo sanguíneo local en los tejidos, pueden explicar una posible diferencia en la distribución de fármacos dependiendo de la hora de dosificación. Las proteínas plasmáticas como la albúmina o glicoproteína ácida α_1 se ha documentado que poseen un tiempo circadiano dependiente, con picos alrededor del mediodía. Como resultado, se han reportado variaciones diarias para fármacos con unión a proteínas plasmáticas, aunque estas variaciones temporales en la unión plasmática del fármaco pueden tener sólo implicaciones clínicas para aquellos medicamentos caracterizados por poseer un alto grado de unión a proteínas y un pequeño volumen de distribución (Ohdo, S., 2010).

El metabolismo hepático de fármacos y la desintoxicación son las funciones principales del hígado, estas funciones dependen de la actividad enzimática y del flujo sanguíneo del órgano. Ambos factores muestran diferencias dependientes del tiempo circadiano (Ohdo, S., 2010).

El metabolismo de los fármacos y la desintoxicación son realizadas por tres clases de proteínas hepáticas (Fase I, II y III). Las Fase I son proteínas de oxidación de fármacos, a la que pertenecen muchas enzimas del citocromo p450 (CYP p450), que son fundamentalmente enzimas implicadas en la oxidación, reducción y reacciones de hidrólisis. Una extensa lista de enzimas del CYP p450 muestran un ritmo circadiano en su actividad, incluyendo las implicadas en el metabolismo de los fármacos, y se ha demostrado que el reloj molecular puede controlar la regulación circadiana basal de estas enzimas del CYP p450. Las enzimas Fase II de conjugación de fármacos incluyen sulfotransferasa, metiltransferasa, y glutatión-S-transferasa. Las Fase III son transportadoras de fármacos de manera pasiva o activa o de eflujo en el intestino, el hígado y

otros tejidos. Se ha demostrado que las proteínas Fase I, II y III presentan patrones rítmicos de expresión en ratones, lo que sugiere que el transporte y el metabolismo de nutrientes y fármacos deben coordinarse para una respuesta máxima (Ferrell y Chiang, 2015). Por lo tanto, la conjugación, la hidrólisis y la oxidación muestran diferencias dependientes del tiempo circadiano (Ohdo, S., 2010).

Para fármacos con una alta relación de extracción, el metabolismo hepático depende del flujo sanguíneo del hígado. Variaciones circadianas en el flujo sanguíneo inducen cambios en la perfusión del hígado y, por lo tanto, variaciones temporales en el aclaramiento de tales fármacos. El ritmo circadiano en el flujo sanguíneo hepático estimado, debe considerarse al evaluar la farmacocinética de los medicamentos de alta extracción en diferentes momentos del día. Tales cambios temporales son de particular interés cuando se tratan de explicar los mecanismos para la dosificación farmacocinética dependientes del tiempo, de fármacos que poseen una alta relación de extracción hepática (Ohdo, S., 2010).

Las variaciones circadianas en el flujo sanguíneo hepático podrían explicar las variaciones temporales en la eliminación de algunos los fármacos, como los anestésicos locales. Un estudio clínico sobre el aclaramiento hepático de verde de indocianina en voluntarios humanos, documentó variaciones diarias del flujo sanguíneo hepático, con los valores más altos observados en la mañana (Chassard y Bruguerolle, 2004). En otro estudio realizado en ratones, cuando se administró lidocaína por vía intramuscular a las 16:00 h, su semivida de eliminación fue más corta que cuando se administró a las 10:00, 22:00 o 04:00 h. La concentración máxima del fármaco (C_{max}) fue la más alta (6 µg/ml) a las 16:00 h y la más baja (3 µg/ml) a las 10:00, 22:00 o 04:00 h. Estos hallazgos fundamentan la mayor susceptibilidad a este tipo de fármacos en el periodo de oscuridad (fase de actividad en estos animales) (Chassard y Bruguerolle, 2004).

Con respecto a la eliminación de los fármacos, funciones fisiológicas renales tales como la filtración glomerular, el flujo sanguíneo renal, el pH urinario y la resorción tubular, pueden mostrar diferencias dependientes del tiempo circadiano con valores más altos durante el día. Estas variaciones rítmicas en las funciones renales, pueden contribuir a cambios circadianos-dependientes en la excreción urinaria de fármacos. La ritmicidad en el pH urinario modifica la ionización de fármacos y esto puede explicar por qué los fármacos ácidos se excretan rápidamente después administrarlos por la noche. Tales variaciones son más pronunciadas para fármacos hidrófilos (Ohdo, S., 2010).

II.2.3.- Cronofarmacodinamia

La *cronofarmacodinamia* o *cronoestesia* estudia las variaciones o cambios rítmicos de susceptibilidad o sensibilidad de las diferentes dianas o lugares de acción de los fármacos, tales como receptores, células, tejidos u órganos. Estos lugares de acción, presentan una sensibilidad variable en función del ritmo circadiano, en consecuencia, las características farmacodinámicas de un receptor (afinidad o actividad intrínseca) dependerán de la fase en la que se encuentra dentro de su ritmo de actividad. Por lo tanto, la sensibilidad de un receptor para una misma dosis

de medicamento varía según el momento de administración a lo largo de las 24 horas, debido al carácter circadiano de actividad de todos los sistemas biológicos del organismo (Betes de Toro, M., 1994).

Varios fármacos pueden producir modificaciones en los ritmos circadianos, que conducen a una alteración de la regulación homeostática. La alteración del ritmo biológico es un nuevo concepto de efectos adversos. Esto puede minimizarse optimizando el horario de dosificación. Los interferones (IFNs), por ejemplo, han sido ampliamente utilizados como agentes antivirales y antitumorales; sin embargo, cuando fueron administrados durante la fase activa en pacientes humanos, se han reportado alteraciones circadianas en recuentos de linfocitos y en niveles de cortisol. La ritmicidad de la actividad locomotora y la temperatura corporal también se vieron gravemente debilitadas por la administración repetitiva de IFN- α . (Ohdo, S., 2007).

Muchos estudios demuestran la razón de ser de la cronoterapia; sin embargo, la investigación en cuanto a la administración de fármacos se ha centrado en producir una velocidad de liberación constante del fármaco. Los avances en la cronobiología y las limitaciones del mercado global llevan el objetivo tradicional de la industria farmacéutica hacia una velocidad de liberación constante del fármaco. El desarrollo futuro en cronofarmacología puede ser realizado mediante nuevas tecnologías, como la biología de sistemas y la nanomedicina (Ohdo, S., 2007).

Los anestésicos generales tienen un efecto cronobiótico. Se cree que las diferencias dependientes de la hora del día en la anestesia, pueden ser debidas a las variaciones circadianas en la sensibilidad del cerebro a los agentes anestésicos. La amplitud de los desplazamientos de fase producidos al administrar propofol perfundido como agente anestésico, representa aproximadamente la mitad del efecto de reposición máxima de un pulso de luz en roedores alojados en constante oscuridad (Challet y col., 2007).

La demanda de los agentes anestésicos está fuertemente correlacionada con el ciclo sueño-actividad, por lo que se han estudiado sobre los aspectos cronobiológicos de los agentes anestésicos durante varias décadas. Sin embargo, el efecto del tiempo de dosificación en las acciones de los hipnóticos comunes intravenosos aún no se ha establecido plenamente en todas las especies. Los receptores del ácido gamma-aminobutírico tipo A (GABA_A), y los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) se consideran sitios importantes para la acción general de los agentes anestésicos. Se ha demostrado la variación circadiana en el número y actividad de los receptores de GABA_A y NMDA (Sato, Y. y col., 2005). Varios estudios han evidenciado que se incrementa la actividad postsináptica tipo A GABAérgica durante las horas nocturnas en humanos, correspondiente a la duración de la máxima eficacia de los agentes anestésicos barbitúricos (Chassard y Bruguerolle, 2004).

La actividad hipnótica del etomidato y del propofol depende de la ritmicidad circadiana del receptor GABA_A. Se ha encontrado un mayor efecto hipnótico del etomidato durante la noche en personas, incluyendo menos mioclonías y también mayor actividad hipnótica del propofol en ratones durante el período de descanso. De igual manera la hora del día influye en el

efecto sedante de las benzodiacepinas como el midazolam y el diazepam, ya que la mayor actividad GABAérgica cerebral se produce en su fase de descanso (Vale y col., 2009).

En cuanto a los analgésicos, en seres humanos se observa una sensibilidad al dolor diferente según la hora del día, siendo mayores los requerimientos de analgésicos en las horas de la mañana, durante la fase de actividad.

En animales de laboratorio, se observó que la duración de la latencia en la respuesta a un estímulo nociceptivo es máxima, cuando los animales se encuentran en su fase de actividad (durante la noche). La respuesta a la administración de morfina mantiene el mismo ritmo diario, elevando los valores absolutos por su acción analgésica en estos animales luego de sufrir un estrés (baños de agua, inmovilización, etc.) (Rebuelto, M., 2004).

En los caballos, los estímulos dolorosos fueron mejor tolerados a las 09:00 y 15:00 h registrándose un aumento en las concentraciones de β -endorfina inmunorreactiva durante la fase de actividad en esta especie (Hamra y col., 1993).

Los ritmos circadianos en los umbrales de dolor sensoriales también han sido demostrados experimentalmente en seres humanos. El umbral de sensibilidad de la encía a un estímulo frío era más bajo entre las 15:00 y las 18:00 h, con un pico en la intensidad del dolor a las 08:00 h. La variación diurna en la percepción del dolor también se ha reportado después de la cirugía abdominal utilizando un dispositivo de analgesia controlado por el paciente. El pico de uso de morfina se produjo a las 09:00 h, y el menor uso se produjo a las 15:00 h en pacientes sometidos a cirugía electiva. La demanda máxima de morfina se produjo en la madrugada en pacientes con postoperatorios ginecológicos (Chassard y Bruguerolle, 2004).

El dolor crónico también ha demostrado tener un patrón circadiano. La mayor intensidad del dolor para la artritis reumatoide se ha informado de que ocurre temprano en la mañana (Labrecque y col., 1995).

Estas experiencias estarían indicando que los niveles de opioides endógenos relacionados con la analgesia sufren variaciones circadianas, justificando asimismo la mayor sensibilidad a la morfina y a otros opiáceos exógenos observados en las horas de mayor actividad (Rebuelto, M., 2004). Esto se debería principalmente, a una modificación en la cantidad de receptores presentes y no en la afinidad del fármaco por los mismos (Naber y col., 1981).

Cronergía es el término que designa los efectos tiempo-dependientes de los fármacos en el organismo como un todo. Es el resultado global de los procesos cronobiológicos de la farmacocinética (cronofarmacocinética) y la farmacodinamia (cronoestesia) (Reinberg, A.E., 1992).

II.2.4.- Cronotoxicidad

La ***cronotoxicidad*** estudia la variación periódica y previsible en función del tiempo, de la sensibilidad o resistencia de una estructura biológica o de un organismo vivo a una agresión. Existe un ritmo circadiano de toxicidad o de resistencia de cada órgano a los muchos efectos adversos de los fármacos. Muchos sistemas enzimáticos de oxidación, como el citocromo P-450, presentan ritmos circadianos de actividad, y la existencia de estos ritmos metabólicos constituyen uno de los mecanismos fundamentales de la cronotoxicidad farmacológica (Betes de Toro, M., 1994).

Los genes del reloj no sólo se expresan en el sistema nervioso central, sino también en otras regiones del cerebro y en varios tejidos periféricos. El hígado es un reloj biológico capaz de generar sus propios ritmos circadianos. Dado que el hígado es un órgano importante en el metabolismo y la desintoxicación, el conocimiento de los efectos circadianos en los procesos bioquímicos y fisiológicos en el hígado puede jugar un papel clave en la toxicología. Como hemos visto en el apartado de cronofarmacocinética, las oscilaciones rítmicas coordinadas en componentes de las fases I y II del metabolismo de los fármacos durante el día, explicarían las respuestas toxicológicas diferenciales a los fármacos (Ohdo, S., 2007). Estas variaciones impactan, indefectiblemente, en los efectos adversos y en la toxicidad de los mismos.

Continuando con el ejemplo de los anestésicos locales, ensayos realizados en ratones, identificaron que las DL₅₀ de ciertos anestésicos locales como bupivacaína, mepivacaína o etidocaína presentaron variaciones circadianas importantes. La menor DL₅₀ (es decir la mayor toxicidad) para estos anestésicos se observó durante el período de actividad de los ratones, a las 22:00, 19:00 y 24:00 h respectivamente, coincidiendo con sus máximas concentraciones plasmáticas (Bruguerolle y Prat, 1990).

Se han documentado también, variaciones temporales en los efectos adversos de algunos agentes antimicrobianos. Los datos registrados en personas y en animales de laboratorio con respecto a los aminoglucósidos, muestran que hay un momento óptimo del día para administrarlos, de forma que la toxicidad que algunos pueden provocar sea menor; la nefrotoxicidad que pueden provocar estos antibióticos por ejemplo, puede ser minimizada cuando se administran durante la mañana o antes del mediodía en individuos con actividad diurna. Otros estudios realizados en animales de laboratorio indican además, que la ingesta de alimentos y el pH urinario también tienen influencia en los efectos tóxicos que estos medicamentos pueden provocar en el riñón (Beauchamp y Labrecque, 2007).

Estudios realizados en conejos con fármacos esteroides antiandrogénicos, como el acetato de ciproterona, demostraron tener su mayor toxicidad alrededor de las 15 h, durante la fase de actividad de estos animales (Boggio y col., 1998).

Son varios los estudios que indican que no sólo la hora del día es importante de cara a una mayor o menor toxicidad y efectos adversos de los fármacos, sino que también tiene una relevancia importante el mes del año en el cual se administran, existiendo por tanto variaciones

estacionales en dicha toxicidad. La toxicidad del fenobarbital por ejemplo, ha sido estudiada en ratones. Una dosis de 190 mg/kg administrada a las 16:00 h en julio, no provocaba la muerte de ningún individuo, sin embargo la misma dosis administrada en enero, provocaba una mortalidad del 90 % de los individuos. Otro estudio demostró que la tolerancia al cisplatino en ratas es 2 veces más alta en invierno que en verano (Spainhour, C.B., 2014).

Estudios cronofarmacológicos llevados a cabo con antiinflamatorios no esteroides (AINE) revelaron variaciones circadianas y circanuales en la eficacia, toxicidad y farmacocinética de estos fármacos. Una revisión de los datos disponibles sugiere que los efectos secundarios producidos por los AINE son más significativos después de la administración por la mañana que por la tarde. Esta información debe ser utilizada por los médicos para determinar cuándo administrar medicamentos a los pacientes artríticos, para optimizar la eficacia y/o para reducir los efectos secundarios de estos fármacos (Labrecque y col., 1995).

Queda demostrado por tanto, que los patrones circadianos y circanuales pueden alterar, significativamente, la susceptibilidad y los niveles de respuesta de los fármacos en los organismos vivos. La falta de consideración de estos parámetros en la realización de estudios puede dar lugar a alteraciones significativas de los perfiles de eficacia, toxicidad, índices terapéuticos, factores de seguridad y tolerancia de los fármacos (Spainhour, C.B., 2014).

II.3.- Agentes anestésicos inyectables

Los anestésicos generales son compuestos altamente solubles en lípidos, pensados inicialmente para actuar modificando de forma inespecífica la estructura de bicapas lipídicas. Un avance importante en la década de 1980 fue la identificación de las proteínas neuronales como objetivos o dianas de los anestésicos. Los estudios de comportamiento y de neuroimagen en humanos y modelos animales demostraron que los agentes anestésicos no deprimen inespecíficamente la función cerebral, sino que causan una compilación de diferentes puntos finales de comportamiento, incluyendo la amnesia, la inmovilidad y la inconsciencia que están mediadas por diferentes regiones del cerebro y poblaciones de receptores (Cheng y col., 2006).

La mayor parte de los anestésicos inyectables como los barbitúricos, el propofol y el etomidato producen anestesia porque acrecientan la transmisión neuronal mediada por el Ácido Gamma Aminobutírico (GABA). Al unirse a estos receptores postsinápticos, inducen un incremento en la conductancia del cloruro que determina una hiperpolarización celular. Esta hiperpolarización celular inhibe o deprime la función neuronal (Maddison y col., 2004). Estudios realizados con ratones han demostrado que poblaciones específicas de receptores GABA ($GABA_A$ Rs) contribuyen a las propiedades sedantes y de inmovilización de estos agentes anestésicos (Cheng y col., 2006). Los agentes anestésicos disociativos como la ketamina, no parecen ejercer efectos sobre el receptor GABA. Inducen un estado disociativo y analgesia merced a su acción como antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Este receptor amplifica las señales excitadoras tras la activación por glicina, al abrir canales de sodio. La ketamina puede bloquear estos canales impidiendo el movimiento de iones (Maddison y col., 2004).

La anestesia general es un proceso reversible, el cual debe inducir la inmovilización, la relajación, el estado de inconsciencia y la liberación del dolor en el paciente. No existe ningún agente anestésico inyectable que reúna todos estos requisitos sin deprimir la función de algún órgano vital. Dado que los fármacos disponibles tienen más bien acciones selectivas dentro del sistema nervioso central, las combinaciones de fármacos son necesarias para conseguir anestesia quirúrgica sin deprimir las funciones vitales. Los agentes anestésicos inyectables inducen la inconsciencia, pero no debilitan, necesariamente, la nocicepción ni la relajación muscular (Thurman, Tranquilli y Benson, 2003).

La selección de los agentes anestésicos se basa en el estado físico del animal, en su temperamento y en el tipo de procedimiento para el cual está considerado utilizar la anestesia (Thurman, Tranquilli y Benson, 2003).

El impacto que producen estos fármacos sobre el organismo provoca importantes cambios, ya que todos los individuos anestesiados desarrollan hipotermia, hipoventilación, e hipoxemia y experimentan algún grado de deterioro de la función cardiovascular. Se debe considerar evitar al máximo estos desequilibrios a fin de prevenir trastornos sobre los sistemas y funciones vitales del organismo (Otero, P.E., 2012).

La inducción anestésica consiste en llevar al paciente a un plano compatible con la intubación oro-traqueal. Consiste en una dosis de “carga” de fármacos hipnóticos, razón por la cual se la cataloga como un evento de alto riesgo (Otero, P.E., 2012).

Una vez que se ha evaluado al paciente, se califica su ASA (calificación del estado físico del paciente según la Sociedad Norteamericana de Anestesiología), el intervalo de valores de este sistema de calificación puede ir de I a VI dependiendo de la gravedad de su estado físico, siendo el ASA I un paciente sano, el ASA II un paciente con enfermedad sistémica leve, el ASA III un paciente con enfermedad sistémica grave, el ASA IV un paciente con riesgo de muerte, el ASA V un paciente moribundo de alto riesgo y el ASA VI, el cual se reserva para medicina humana, se refiere a un paciente declarado clínicamente muerto, pero que debe ser mantenido vivo para la donación de órganos. Se determina, además, el grado de deterioro funcional que deriva de la patología subyacente. De esta manera, con estos parámetros (estado físico y deterioro funcional), se define el riesgo anestésico para un determinado paciente (Otero, P.E., 2012).

Los agentes anestésicos inyectables pueden utilizarse por vía intramuscular o por vía intravenosa. La vía intramuscular se puede utilizar para administrar opiáceos (morfina, butorfanol, nalbufina), anestésicos disociativos (ketamina) y benzodiacepinas (midazolam). Los tiobarbitúricos (pentotal, tiopental), el propofol y el etomidato se administran exclusivamente por vía intravenosa (Thurman, Tranquilli y Benson, 2003).

Como ventajas asociadas a los agentes anestésicos inyectables se citan, entre otras, el bajo costo económico, la rapidez en la inducción y la falta de necesidad de equipamiento adicional para su administración. Sin embargo, existen desventajas inherentes al uso de estos

fármacos, entre los que se incluye la gran variabilidad en términos de respuesta, tanto en cada animal como interespecies, así como la posibilidad de provocar, con algunos fármacos, un prolongado período de recuperación y de producir una grave depresión cardiovascular y respiratoria, motivos por los que su uso puede verse limitado en algunos tipos de pacientes (Thurman, Tranquilli y Benson, 2003).

El manejo anestésico de los animales con disfunción cardiopulmonar o enfermedades sistémicas de los principales órganos y sistemas cada vez es más frecuente en la medicina veterinaria actual. El manejo anestésico de animales con disfunción cardiovascular puede ser un desafío, porque la mayoría de los agentes preanestésicos y anestésicos son capaces de deprimir el sistema nervioso central y de producir diferentes grados de depresión cardiovascular, lo cual predispone a estos animales a sufrir sobrecarga de fluidos, arritmias, frecuencias cardíacas extremas e inclusive la pérdida de la capacidad de reserva cardíaca necesaria para compensar la depresión inducida por los anestésicos. El uso de agentes anestésicos que provoquen hipotensión puede exacerbar hipotensiones preexistentes, por ejemplo en casos de shock hipovolémico, cardiogénico o vascular. En animales con patologías neurológicas, como masas intracraneales, traumatismos encefálicos o desequilibrios en la autorregulación del líquido cefalorraquídeo, se puede provocar un aumento importante de la presión intracraneal lo que puede conllevar una isquemia cerebral grave. En estos pacientes deben considerarse los efectos dinámicos de la presión intracraneal, el flujo sanguíneo cerebral y la producción y el flujo del líquido cefalorraquídeo. En estos casos está especialmente recomendado el uso de agentes anestésicos como el etomidato, que no provoquen alteraciones severas en el sistema cardiovascular o en la presión intracraneal (Thurman, Tranquilli y Benson, 2003).

II.4.- Etomidato

II.4.1- Principio activo

El etomidato es un anestésico no barbitúrico, derivado carboxilado imidazólico, concretamente su estructura química es 1-[(1*R*)-1-feniletil] imidazol-5-carboxilato de etilo (Figura II.4). Se utiliza fundamentalmente como un agente de inducción anestésica por su rapidez de acción y es conocido por la estabilidad cardiovascular que se produce luego de su administración. Existen dos isómeros: R (+) y S (-), pero el isómero R (+) es el único con propiedades anestésicas (Posner, L.P., 2007).

El pKa del etomidato es de 4,24. El anillo de imidazol permite que este fármaco posea diferentes solubilidades a diferentes pH, es soluble en agua a pH ácido y soluble en lípidos a pH fisiológico, con casi el 99% del fármaco no ionizado en la sangre (Vanlersberghe y Camu, 2008).

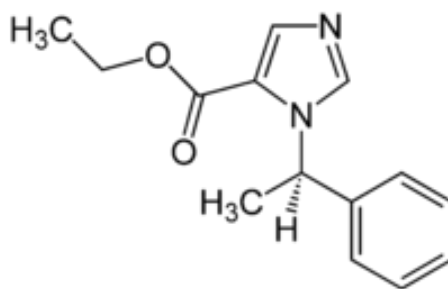


Figura II.4.- Estructura química del etomidato.

El etomidato se introdujo para el uso clínico en el año 1972 en Europa y en el año 1983 su uso fue aprobado en Estados Unidos. Su primer solvente fue el cremophor, al cual se le adjudicaron muchos efectos adversos. Actualmente, se comercializa a nivel mundial como una preparación que contiene 2 mg/ml solubilizado en propilenglicol (solución de pH 5,1 y osmolaridad de 4,965 mOsmol/L) o en una emulsión de lípidos (solución de pH 7,6 y osmolaridad de 400 mOsmol/L) (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Se ha demostrado que el solubilizante propilenglicol es responsable de una gran incidencia de tromboflebitis y dolor en la inyección. Estos efectos no deseados se pueden evitar mediante el uso de la formulación solubilizada en emulsión lipídica, la cual está compuesta por triglicéridos de cadena media y larga, utilizando como solvente leche de soja, similar a la solución utilizada con el propofol. Esta preparación disminuye la incidencia de tromboflebitis y dolor a la inyección, sin que las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas se vean afectadas (Doenicke y col., 1990).

El propilenglicol, además, es un vehículo menos seguro para el etomidato que la emulsión lipídica, ya que produce un incremento significativo de hemoglobina libre en plasma y una disminución marcada de haptoglobina, lo cual es una señal apreciable de hemólisis intravascular, resultando en un alto riesgo de toxicidad en pacientes que presenten una disfunción renal o aquellos en shock que necesiten altos volúmenes de transfusión sanguínea. Otros efectos colaterales producidos por el propilenglicol incluyen hipotensión, acidosis láctica e hipertensión pulmonar. (Doenicke y col., 1997).

II.4.2- Usos y mecanismo de acción

El etomidato está indicado para la inducción anestésica rápida intravenosa, particularmente en pacientes con inestabilidad cardiovascular (Posner, L.P., 2007).

La acción anestésica es consecuencia de la facilitación de la transmisión mediada por GABA, al interactuar con una zona alostérica del complejo receptor GABA – ionóforo Cl^- . La acción sedante/hipnótica del etomidato depende de que el receptor GABA contenga en su estructura subunidades β_2 y de forma similar, la inmovilidad inducida es dependiente de la presencia de subunidades β_3 ; de esta manera ejercería su acción sobre la transmisión sináptica

incrementando la conductancia a iones cloruro, induciendo una hiperpolarización de la membrana y reduciendo la capacidad de respuesta celular (O'Meara, G.F., 2004).

Se han identificado remanentes de aminoácidos en las subunidades β_3 que son esenciales para la activación de la función del receptor GABA_A por el etomidato. Dentro del poro del canal iónico, el aminoácido sp265 situado en la región TM2 que abarca la membrana de las subunidades β_3 le confiere la actividad anestésica a este fármaco (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Dado que los receptores GABA se encuentran casi exclusivamente en las terminaciones nerviosas postsinápticas en el sistema nervioso central, se presentan pocos efectos periféricos (cardiovasculares o respiratorios) (Posner, L.P., 2007).

El etomidato se administra por vía intravenosa y la dosis de administración se calcula en base al peso corporal. Una dosis de 1 a 2,2 mg/kg es adecuada para realizar una inducción anestésica (Ilkiw, J., 2002). Posee un amplio margen de seguridad dependiendo de la especie en la que se lo utilice, el índice terapéutico (dosis letal/dosis hipnótica, DL₅₀ / DH₅₀) es de 16 en perros, es decir la dosis letal es 16 veces la dosis hipnótica, muy elevada en comparación con los índices terapéuticos para propofol y tiopental los cuales son de 3 y 5, respectivamente (Ilkiw, J., 2002; Posner, L.P., 2007).

Su inicio de acción se produce a los 5 - 15 segundos postadministración, y la duración de la inconsciencia después de una sola dosis es de aproximadamente 5 a 15 minutos (Yeung y Zed, 2002). Debido a su redistribución en los tejidos corporales, el despertar y el tiempo de recuperación de la anestesia son similares a los del tiopental, pero más lentos que los del propofol (Posner, L.P., 2007).

De los agentes de inducción disponibles en la actualidad, el etomidato ofrece el perfil de seguridad más favorable y es el que menores efectos adversos puede producir en pacientes con condiciones médicas desconocidas o no tratados. Se ha estudiado en los servicios de urgencias y se recomienda su uso para la inducción anestésica durante la intubación de secuencia rápida en grupos específicos de pacientes en los departamentos de emergencias (Yeung y Zed, 2002). Posee claras ventajas como un agente de inducción en pacientes críticos en comparación con otros agentes de inducción disponibles, con ventajas como la estabilidad hemodinámica, el efecto clínico predecible, rápido inicio de acción y corta duración (Nestor y Burton, 2008).

El etomidato no proporciona ninguna analgesia por lo que conjuntamente se deben administrar analgésicos (opiáceos o agonistas adrenérgicos α -2) para facilitar la anestesia en los procedimientos dolorosos o de cirugía (Posner, L.P., 2007). Además, pueden observarse rigidez muscular y mioclonías durante y después de la inducción, que no están asociadas a convulsiones. El uso de benzodiazepinas previo a su administración, puede minimizar la incidencia e intensidad de los movimientos musculares (Doenicke y col., 1999).

II.4.3- Farmacocinética

Tras la administración intravenosa, la distribución del etomidato es rápida y sigue un modelo farmacocinético de 3 compartimientos. La distribución inicial de semivida es de $2,6 \pm 1,3$ min. y la semivida de eliminación es de $4,6 \pm 2,6$ h. El volumen total aparente de distribución (V_{dds}) es de $4,5 \pm 2,2$ l/kg, lo que indica una amplia captación tisular. Su alta solubilidad en lípidos permite la distribución rápida en la mayoría de los órganos y tejidos, la mayor concentración del fármaco ocurre en el cerebro pasado 1 minuto de la inyección intravenosa. La eliminación del cerebro también es rápida, y la disipación de la acción hipnótica se relaciona principalmente con la redistribución a los tejidos inactivos (Yeung y Zed, 2002).

A un pH fisiológico de 7,4 se encontró que el 78,5% del fármaco se encuentra unido a la albúmina humana, mientras que a la γ -globulina no se une más de un 3%. (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Debido a que sólo la fracción libre es farmacológicamente activa, los cambios en la concentración de albúmina, en el pH o el uso concomitante de otros fármacos capaces de desplazarlo de su unión a proteínas, pueden alterar el porcentaje de la fracción libre del fármaco y consecuentemente sus efectos clínicos (Yeung y Zed, 2002).

En presencia de una concentración estable de fentanilo (10 ng/ml) el aclaramiento del etomidato se redujo desde, aproximadamente, 1,6 a 0,4 l/kg.h, con poca alteración de la semivida de eliminación. El volumen inicial de distribución (V_c) se redujo de 21 l/kg a 5 l/kg y el volumen aparente de distribución (V_{dds}) de 2,7 l/kg a, aproximadamente, 0,67 l/kg. La naturaleza exacta de esta interacción cinética de fármacos no se conoce, posiblemente pueda deberse a una saturación de las enzimas responsables en el metabolismo del etomidato (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Las variables farmacocinéticas del etomidato en gatos tras la administración IV de 3,0 mg/kg de peso corporal, fueron semivida de distribución rápida ($t_{1/2\alpha}$) 0,05 h; semivida de distribución lenta ($t_{1/2\beta}$) 0,35 h; semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) 2,89 h; volumen aparente de distribución (V_d) $11,87 \pm 4,64$ L/kg, volumen aparente de distribución en estado estacionario (V_{dss}) $4,88 \pm 2,25$ L/kg, volumen aparente del compartimiento central (V_{dc}) $1,17 \pm 0,70$ L/kg y el aclaramiento total $2,47 \pm 0,78$ L/kg.h. (Wertz y col., 1990).

Dado su alto volumen de distribución (4,5 L/kg.) su semivida media de eliminación es prolongada (2,89 h), si bien al metabolizarse rápidamente por microsomas hepáticos y esterasas plasmáticas, se alcanzan concentraciones sub-hipnóticas y por lo tanto presenta una corta duración clínica (Wertz y col., 1990)

En los seres humanos, el 98% del fármaco es metabolizado en el hígado por hidrólisis mediante esterasas plasmáticas, o glucuronidación a través de enzimas microsomales hepáticas, sólo el 2% se excreta sin cambios por la orina. Los metabolitos son inactivos y se excretan el 85% por la orina y el 15% restante a través de la bilis y las heces. Por lo que este fármaco debe

utilizarse con precaución en pacientes con enfermedades hepáticas graves ya que el metabolismo puede ser prolongado en este tipo de pacientes (Posner, L. P., 2007). Sin embargo, debido a que la duración de la hipnosis depende principalmente de la redistribución desde el cerebro a los tejidos inactivos, la disfunción hepática no afecta a la duración de los efectos clínicos (Yeung y Zed, 2002).

II.4.4.- Efectos farmacológicos sobre órganos y sistemas

II.4.4.1.- Sistema cardiovascular

La hipotensión postinducción anestésica, se ha definido como una disminución en la presión arterial media por debajo de 60 mmHg o por un 40% de disminución desde el valor inicial y está asociada con una mayor morbilidad y mortalidad. Los pacientes que experimentaron episodios de entre 1 y 5 minutos de hipotensión, después de la inducción de la anestesia general, tuvieron un incremento del 13,3% en la estancia hospitalaria y un aumento del 8,6% en la mortalidad. Dado el alto riesgo existente de hipotensión después de la inducción o intraoperatoria, el agente de inducción ideal debería evitar cualquier desviación importante de los parámetros hemodinámicos basales (Budde y Mets, 2013).

En comparación con otros agentes de inducción, se cita como ventaja del etomidato la estabilidad hemodinámica (Brussel y col., 1989). Es el único, entre la mayoría de los anestésicos inyectables que se administran por vía intravenosa, que produce cambios hemodinámicos mínimos y por lo tanto mantiene estable la función cardiovascular (Posner, L.P., 2007). Por lo tanto, puede usarse de manera segura en pacientes hemodinámicamente inestables y en aquellos con isquemia miocárdica o infarto (Yeung y Zed, 2002).

Tras la administración, la frecuencia cardíaca y la presión arterial no varían (Thurmon y col., 2003). A las dosis de inducción habituales, el etomidato provoca cambios mínimos en el volumen sistólico, en la presión arterial media, en el índice cardíaco, en la presión arterial pulmonar, en la presión de enclavamiento pulmonar arterial, en la presión venosa central y en la resistencia vascular sistémica, además no es arritmogénico (Posner, L.P., 2007). Para los pacientes con taquicardia o hipertensión, la premedicación con fentanilo puede hacerse conjuntamente para mejorar la estabilidad cardiovascular (Yeung y Zed, 2002).

Al igual que con otros agentes anestésicos, el etomidato indujo disminuciones moderadas en la presión arterial media, presumiblemente, como resultado de una depresión en el control neural de la vasculatura periférica, por una depresión en la generación central de tono neural, que puede contribuir a atenuar la actividad del sistema nervioso simpático central. No se ha establecido efecto directo del etomidato respecto de la función del órgano receptor o la transmisión aferente cuando están involucrados reflejos, o en la transmisión sináptica en el nivel del ganglio autónomo o en la unión neuromuscular del músculo liso vascular (Vanlersberghe y Camu, 2008).

La interacción de etomidato con adrenorreceptores α_{2B} podría aumentar la presión arterial y contribuir a la estabilidad cardiovascular observada en los pacientes luego de la inducción anestésica (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Esto se debe a que, como es un derivado de imidazol, el etomidato tiene similitudes estructurales con los receptores α_{2B} . El etomidato se une a la periferia de los receptores α_{2B} , causando vasoconstricción periférica, lo que contribuye al perfil hemodinámico estable de este agente. Por lo tanto, el uso de etomidato para la inducción de la anestesia general puede obviar el tratamiento de la hipotensión postinducción. Los pacientes con compromiso cardiovascular pueden depender de un tono simpático alto para mantener su resistencia vascular sistémica, la presión arterial y el gasto cardíaco. En este sentido, el etomidato parece ser un agente de inducción ideal en comparación con propofol, tiopental o ketamina (Budde y Mets, 2013).

Puede sin embargo, producir un efecto inotrópico negativo dosis dependiente en el miocardio, pero en menor medida que otros anestésicos inyectables como ketamina, propofol o tiopental (Kissin y col., 1983; Kawakubo y col., 1999).

En comparación con propofol, etomidato ha demostrado mantener el tono simpático después de las dosis habituales de inducción, mientras que el propofol disminuye este tono. Por lo tanto, la presión arterial, la frecuencia cardíaca, o la resistencia vascular sistémica se conservan después de administrar el etomidato pero no después de la inducción con propofol. La ketamina tiene en común con el etomidato, que mantiene la resistencia vascular sistémica después de la inducción de la anestesia. Sin embargo, debido a que la ketamina es un fármaco con un significativo efecto inotrópico negativo, la inducción de la anestesia en pacientes con shock, que han agotado las reservas de catecolaminas, puede resultar en una hipotensión significativa. En voluntarios sanos, el etomidato administrado en la inducción de la anestesia general en combinación con midazolam, no mostró alteraciones en las mediciones hemodinámicas. Sin embargo, tiopental y propofol condujeron a disminuciones en el inotropismo y la postcarga y, por lo tanto, a una disminución de la presión arterial sistólica (Budde y Mets, 2013).

En pacientes pediátricos, también se presenta una baja incidencia de hipotensión clínicamente importante cuando se utiliza etomidato en protocolos de emergencias (Yeung y Zed, 2002).

Los pacientes con enfermedad coronaria grave no mostraron alteraciones importantes en la función cardíaca o en la hemodinámica al utilizarse el etomidato en la inducción anestésica. En estudios realizados en personas se observó que luego de la infusión del etomidato, el flujo coronario aumentó ligeramente y la resistencia coronaria se redujo en el mismo grado, dejando una presión de perfusión coronaria constante. El consumo de oxígeno del miocardio no fue alterado y el trabajo cardíaco disminuyó en proporción a la disminución en la presión arterial media. Sólo a altas velocidades de infusión, con altas concentraciones de fármaco en plasma, se observó una disminución del gasto cardíaco y del flujo sanguíneo en el hígado (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Haessler y col.(1992) compararon el etomidato y el propofol combinados con fentanilo para la inducción de pacientes con insuficiencia aórtica o enfermedad de las arterias coronarias. La hipotensión arterial, definida como la presión arterial sistólica menor a 100 mmHg, se produjo en 5 de 6 pacientes en el grupo del propofol. La presión sistólica media después de la administración del propofol disminuyó de 135 a 89 mmHg. Esta disminución en la presión sanguínea arterial dio lugar a una isquemia miocárdica, determinada por un aumento en la presión de enclavamiento de la arteria pulmonar (de 5 a 10 mmHg en 2 pacientes). En comparación con el propofol, el etomidato causó sólo pequeños cambios en la presión arterial sistólica (de 130 a 114 mmHg) y la resistencia vascular sistémica (de 1,416 a 1,617 dina. s/cm). La frecuencia cardíaca y la presión capilar pulmonar en los pacientes que recibieron etomidato se mantuvieron casi sin cambios (de 64 a 61 latidos/min y de 8,2 a 8,3 mmHg, respectivamente).

En los pacientes con lesiones cardíacas valvulares, se desea el mantenimiento de la precarga en las estenosis y las lesiones regurgitantes. Preservar o incluso aumentar la postcarga es el objetivo terapéutico para lesiones estenóticas, como la estenosis aórtica, cardiomiopatías hipertróficas obstructivas y la estenosis mitral. El etomidato parece ser el agente de inducción ideal en tales pacientes (Mutlak y col., 2011)

Los pacientes con enfermedad de la válvula aórtica o mitral respondieron al etomidato con una caída del 19% de la presión arterial media, lo que se asoció con una disminución de la resistencia vascular sistémica y del índice de trabajo sistólico del ventrículo izquierdo. El índice cardíaco y la presión arterial pulmonar se redujeron ligeramente, y la presión venosa central se mantuvo sin cambios (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Bendel y col. (2007) compararon los parámetros hemodinámicos en 66 pacientes con estenosis aórtica después de la inducción con propofol o etomidato. Los episodios de hipotensión se definieron como una presión arterial media menor a 70 mmHg. Se administró fenilefrina si la presión arterial media se mantuvo por debajo de 70 mmHg durante más de 30 s. La presión arterial media disminuyó en los 2 grupos; sin embargo, la disminución fue, significativamente, más pronunciada en el grupo del propofol (presión arterial media 67 mmHg) en comparación con el grupo del etomidato (presión arterial media 79 mmHg). La presión arterial media descendió más allá del umbral de 70 mmHg antes de la administración de fenilefrina (a 60 mmHg en el grupo del propofol y 69 mmHg en el grupo del etomidato). Los pacientes en el grupo del propofol tuvieron más probabilidades de recibir fenilefrina antes de la intubación (20/30 vs. 8/30) para combatir la hipotensión significativa.

Los efectos del etomidato sobre las células musculares lisas vasculares han sido ampliamente investigados. En las células del músculo liso vascular aórtico de rata, el etomidato inhibió moderadamente la angiotensina II inducida por la entrada de calcio. También produjo un desplazamiento significativo hacia la derecha en las curvas de dosis-respuesta de la acetilcolina, la fenilefrina y 5-hidroxitriptamina, así como la contracción de la aorta de rata inducida por cloruro de potasio. Estos datos indican que el etomidato puede alterar la respuesta vascular de los agentes vasoactivos endógenos y exógenos. Sin embargo, estos efectos se produjeron a concentraciones superiores a la concentración clínicamente relevante, y por lo tanto el efecto del

etomidato en los sistemas de regulación de la presión arterial en condiciones clínica es limitada (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva a menudo son tratados con inhibidores del enzima convertidor de angiotensina (IECA) y los bloqueantes de los receptores de angiotensina. Los IECA disminuyen la reactividad del sistema nervioso simpático y ponen a los pacientes en alto riesgo de hipotensión postinducción. Se compararon los parámetros hemodinámicos en pacientes tratados con enalapril después de una inducción con propofol o etomidato. El efecto sobre la presión arterial sistólica fue, significativamente, diferente entre los 2 agentes. Los pacientes inducidos con propofol mostraron una disminución, significativa, del valor inicial de la presión arterial sistólica (de 120 a 96 mmHg), mientras que la inducción con etomidato resultó en una disminución mínima en la presión arterial sistólica (de 125 a 120 mmHg) (Malinowska-Zaprzalka y col., 2005).

Se ha descrito la aparición de fibrilación ventricular, en pacientes humanos, después de la inducción de la anestesia con la administración de etomidato. La fibrilación ventricular (FV) es una condición cardíaca en la que los ventrículos entran en estado caótico y se contraen de manera inefectiva. Esto puede causar resultados muy graves si no es tratada a tiempo. El paciente debe ser sometido inmediatamente a la desfibrilación (choque bifásico de 200 J) hasta obtener nuevamente el ritmo sinusal normal. Según el Programa de Notificación de Efectos Secundarios (FAERS), de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, se registraron cuatro eventos de fibrilación ventricular asociados al etomidato (Karcioglu y col., 2014).

El etomidato ha sido utilizado satisfactoriamente en las mujeres embarazadas, ya que tiene poca o ninguna influencia sobre el estado ácido base de la madre o el bebé y un estado clínico satisfactorio del recién nacido después del parto por cesárea (Domínguez y col., 2013).

Estudios realizados en ovejas gestantes demostraron que un solo bolo de inducción de etomidato no induce efectos cardiovasculares ni en la madre ni el feto. La administración de etomidato no causó alteraciones en el patrón doppler normal de las arterias umbilicales como tampoco en los índices vasculares, sugiriendo que no hay cambios en la resistencia de la placenta. Por lo tanto, estos resultados pueden sugerir que este agente anestésico parece ser seguro para su uso durante la gestación. Sin embargo, el etomidato induce un efecto de vasoconstricción periférica mediado por los receptores adrenérgicos α_{2B} , que también están presentes en la placenta. Los receptores adrenérgicos pueden desempeñar un papel importante para la mediación de una variedad de mecanismos metabólicos y hemodinámicos, incluyendo el flujo de sangre de la placenta; aunque los efectos de este fármaco sobre el flujo de sangre de la placenta no han sido aún estudiados (Domínguez y col., 2013).

II.4.4.2.- Sistema Nervioso Central

La anestesia con etomidato se asocia con concentraciones plasmáticas entre 0,3-0,5 µg/ml, y si se elevan por encima de 1,0 µg/ml se produce una supresión brusca del electroencefalograma (EEG). El tiempo medio de equilibrio entre sangre/cerebro ($t_{1/2 k_{e0}}$) fue de 1,6 min, que representa la velocidad de equilibrio entre las concentraciones en el plasma y en la biofase. La sensibilidad del cerebro se expresa como la magnitud de la desaceleración máxima del borde espectral del electroencefalograma (E_{max}) y tiene un valor de 7,2 Hz; la concentración media plasmática del fármaco que provocó el 50% de la máxima desaceleración del EEG (IC_{50}) fue de 0,39 µg/ml. Los estudios en voluntarios utilizando EEG de frecuencia mediana como sustituto para el efecto hipnótico y modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) establecieron un valor medio IC_{50} de 0,32 µg/ml. El mayor efecto depresivo, IC_{90} se logró a concentración plasmática de 0,56 µg/ml. Basándose en las curvas de respuesta de concentración de estos estudios y los valores de IC_{50} , la relación de potencia relativa para el efecto hipnótico puro del etomidato frente al del tiopental fue de 50:1 (Vanlersberghe y Camu, 2008).

El etomidato da lugar a una disminución de la presión intracraneal (PIC), disminución del flujo sanguíneo cerebral, y disminución de la tasa metabólica cerebral de oxígeno. Puesto que la presión arterial media es mantenida esencialmente sin cambios, provoca un estado metabólico favorable para el sistema nervioso central; la presión de perfusión cerebral se incrementa al igual que la relación entre el suministro de oxígeno cerebral frente a la demanda del mismo. Produce un aquietamiento en el registro de EEG (similar a los barbitúricos), pero puede aumentar la actividad en focos epileptogénicos. Se han reportado convulsiones Grand-mal durante su utilización (Bergen y Smith, 1997).

El etomidato parece tener actividad anticonvulsiva a altas dosis, este agente ha presentado un EEG similar al obtenido con tiopental (presencia de silencio eléctrico). Sin embargo, en las dosis clínicas habituales presenta características proconvulsivas. En pacientes epilépticos, el etomidato puede desencadenar actividad epiléptica subcortical o cortical, esto quedó demostrado en un estudio realizado en 12 pacientes con epilepsia, en los cuales la administración de etomidato, causó un EEG epiléptico en 9 de ellos, y fue grave en 6 casos. Por lo tanto, se recomienda evitar su uso en pacientes epilépticos (Bruder y Bonnet, 2001; Maranhão y col., 2011).

El etomidato reduce el flujo sanguíneo y el consumo de oxígeno cerebral, lo que atenúa la presión intracraneal elevada y limita los picos de presión intracraneal asociados con la intubación. A diferencia del tiopental y el propofol, el etomidato reduce la presión intracraneal sin disminuir la presión arterial o la presión de perfusión cerebral (Yeung y Zed, 2002).

Debido a estas propiedades, el etomidato se considera un agente neuroprotector y, a menudo, es utilizado para atenuar los efectos de la isquemia cerebral en los procedimientos quirúrgicos neurovasculares que requieren oclusión arterial cerebral temporal (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Los efectos neuroprotectores del etomidato han sido investigados en varios modelos animales de isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas y traumatismos de la médula espinal. Se investigaron los efectos del etomidato sobre el estrés oxidativo en la hiperglucemia inducida por estreptozotocina en el cerebro y la médula espinal de rata. Se utilizaron como marcadores al malondialdehído, el nitrito total y la actividad de la xantina oxidasa. El tratamiento con etomidato impidió en parte la elevación del malondialdehído, la xantina oxidasa, y los niveles de nitrito en el hipocampo, la corteza, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal de las ratas. Estos datos sugirieron un efecto neuroprotector en el tejido neuronal contra el daño diabético oxidativo (Ates y col., 2006).

Un efecto neuroprotector similar se demostró en lesiones de la médula espinal experimental en ratas con etomidato a razón de 2 mg/kg, metilprednisolona, y la combinación de ambos fármacos. Cuando se administró inmediatamente después de la lesión medular, el etomidato ofreció una neuroprotección similar a la metilprednisolona. Sin embargo, el tratamiento combinado con metilprednisolona y etomidato no proporcionó una mejor protección que la obtenida con cada fármaco administrado por separado (Cayli y col., 2006).

II.4.4.3.- Sistema Respiratorio

En relación con el tiopental o el propofol, el etomidato tiene efectos respiratorios mínimos (Yeung y Zed, 2002).

Dosis de inducción elevadas pueden dar lugar a breves períodos de apnea, pero en general la presión arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) aumenta sólo ligeramente. La presión arterial de oxígeno (PaO_2) generalmente no se ve afectada. Sin embargo, cuando se administra con otros fármacos que afectan la función del sistema nervioso central, puede observarse una mayor depresión respiratoria. Al poseer un efecto limitado en la relajación muscular, los reflejos de las vías respiratorias son generalmente mantenidos (Posner, L.P., 2007).

Produce una depresión en los centros medulares que modifican el impulso ventilatorio en respuesta a las tensiones cambiantes de CO_2 , pero este efecto es menos pronunciado que el de los barbitúricos. Reducciones inducidas en el volumen corriente se vieron compensadas por aumentos compensatorios en la frecuencia respiratoria. De todos modos, estos efectos sobre la ventilación son transitorios y duran sólo unos minutos (Vanlersberghe y Camu, 2008). La preoxigenación de tres minutos con alto flujo de oxígeno antes de los procedimientos de anestesia con etomidato, reduce notablemente la incidencia de depresión respiratoria (Marinsek y col., 2008).

Sin embargo, los pacientes con una fuente pulmonar primaria de insuficiencia respiratoria, particularmente aquellos con un componente de broncoconstricción como el asma, probablemente, se beneficiarían mediante el uso de un agente con efectos broncodilatadores tales como la ketamina (Nestor y Burton, 2008).

II.4.4.4.- Sistema Endócrino

La preocupación más importante en cuanto al uso del etomidato es su efecto sobre la función adrenocortical. A principios de 1980 se observó que hubo una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes sedados a largo plazo (por ejemplo, los pacientes con respiradores artificiales) con etomidato, debido a una disminución de la producción de cortisol plasmático (Wagner y col, 1984).

El etomidato causa una inhibición reversible de la enzima 11 β -hidroxilasa. Esta supresión se produce a concentraciones muy bajas de etomidato, debido a la alta afinidad de unión entre el nitrógeno básico en el anillo de imidazol del fármaco y el hierro hemo en el sitio activo de la enzima. Las enzimas del citocromo P450 (incluyendo la enzima 11 β -hidroxilasa) contienen grupos prostéticos hemo en sus sitios activos (Ge y col., 2013).

La disminución resultante de cortisol, corticosterona y en la producción de aldosterona plantea riesgos en la capacidad del paciente para responder al estrés y es un problema potencial cuando se utiliza este fármaco como agente de infusión continua durante días o semanas en las unidades de cuidados intensivos. Por lo que no se recomiendan largos períodos de uso a través de infusiones constantes (Yeung y Zed, 2002; Posner, L.P., 2007).

La supresión adrenal resultante reduce los niveles de cortisol y aldosterona aproximadamente 30 minutos después de la inducción, con una duración de entre 5 y 15 horas en pacientes humanos. Sin embargo, después una sola dosis de inducción, la disfunción adrenal es mínima, no causa problemas clínicos serios y se resuelve en 12 horas (Yeung y Zed, 2002). De todos modos, se debe tener especial cuidado con los pacientes que poseen enfermedades suprarrenales preexistentes (por ejemplo, hipoadrenocorticismo) (Posner, L.P., 2007).

En perros, después de la inducción con etomidato, la supresión del eje adrenocortical se mantiene durante un máximo de 6 horas (Dodam y col., 1990), mientras que en gatos es de aproximadamente 3 horas (Moon, P.F., 1997).

El uso del etomidato para la sedación procesal y de secuencia rápida de intubación en pacientes con lesiones críticas, aumenta el riesgo de insuficiencia suprarrenal. La exposición al etomidato es un factor de riesgo modificable para el desarrollo de esta patología. En estos pacientes, el diagnóstico oportuno y el tratamiento a tiempo, reducen drásticamente los índices de mortalidad (Cotton y col., 2008).

Teniendo en cuenta las razones de peso para el uso de etomidato en la intubación endotraqueal de emergencia, la administración de suplementos de esteroides, sobre todo en las primeras 24 horas de postinducción, puede ser un importante complemento de la terapia para prevenir posibles efectos perjudiciales en este tipo de pacientes (Nestor y Burton, 2008).

Algunos autores sugirieron que la adrenalectomía farmacológica producida por el etomidato, tiene un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes con shock séptico y

que se debía consensuar el uso de este fármaco fuera de la investigación clínica en estos grupos de riesgo, hasta que se asegurase su utilidad y seguridad (Bloomfield, R. y Noble, D. W., 2006). Sin embargo, estudios recientes indicarían que la insuficiencia suprarrenal inducida por etomidato puede que no se corresponda con el peor resultado en la sepsis, ya que la mortalidad en sepsis y el grado de lesión suprarrenal causada por etomidato no estarían correlacionados. El etomidato inhibe el NF-kB (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*), éste es un complejo proteico implicado en la respuesta al estrés provocado por diversos estímulos, como pueden ser las citoquinas y los antígenos bacterianos o virales, entre otros, y consecuentemente, al ser usado en pacientes sépticos, esta puede ser la causa responsable de la mayor mortalidad y no la insuficiencia suprarrenal (Zhang y col., 2015).

El metoxycarbonil-etomidato, es un análogo de etomidato diseñado para ser metabolizado rápidamente por esterasas y ha demostrado que no produce la supresión adrenocortical prolongada en ratas después de la administración en bolo (Cotten y col. 2010). Esta función adrenocortical fue suprimida durante 120 min mediante la administración de infusiones continuas de metoxycarbonil-etomidato y etomidato en un modelo experimental con ratas. Sin embargo, después de finalizada la infusión, la recuperación adrenocortical se produjo en menos de 30 min en los animales anestesiados con metoxycarbonil-etomidato, pero persistió durante más de 3 h en los que recibieron etomidato (Ge y col., 2013).

Es bien sabido que las hormonas esteroides son esenciales para un gran número de procesos fisiológicos vitalmente importantes. Sin embargo, también están asociadas con enfermedades potencialmente mortales. La aplicación de antagonistas de receptores de hormonas esteroides o inhibidores de la biosíntesis de estas hormonas, se consideran como métodos terapéuticos de elección para estas enfermedades. Hoy en día, los inhibidores de segunda y tercera generación se utilizan como agentes terapéuticos de primera línea para el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas esteroides. Los inhibidores selectivos de la enzima 11 β -hidroxilasa y de la aldosterona sintasa como el etomidato, se presentan como nuevos clientes potenciales en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades cortisol-dependientes (Hille y col., 2010).

Además se cita como ventaja que el etomidato no causa liberación de histamina posterior a su administración (Yeung y Zed, 2002).

II.4.4.5.- Sistema Muscular

El etomidato no produce relajación muscular importante, pueden observarse rigidez muscular y mioclonías durante y/o después de la inducción anestésica (Doenicke y col., 1999). Se cree que las mioclonías resultan de la desinhibición subcortical en lugar de la estimulación del sistema nervioso central. Además de aumentar el riesgo de aspiración en los pacientes con el estómago lleno, las mioclonías también pueden aumentar la presión intraocular y causar problemas en los pacientes que serán sometidos a cirugía de ojos (Isitemiz y col., 2014).

Cuando se utiliza etomidato en ausencia de relajantes musculares o sedantes, entre un 50% y un 80% de los pacientes experimentan mioclonías (Yeung y Zed, 2002). A su vez, el 84% de estos pacientes las sufrió cuando el fármaco se administró durante un periodo de 10 segundos, mientras que solo el 28% de los pacientes desarrollaron mioclonías cuando la inyección se hizo más lentamente, durante un período de 2 minutos. Esto indica que la velocidad de administración intravenosa del etomidato tiene incidencia directa en el porcentaje de aparición de mioclonías (Isitemiz y col., 2014).

Además del tiempo que dura la administración, es importante el tipo de premedicación que se utiliza para minimizar o eliminar el riesgo de mioclonías tras la inducción con etomidato. El pretratamiento con una pequeña dosis (0,06 mg/kg) de rocuronio tres minutos antes de la inducción, reduce notablemente esta incidencia (Choi y col., 2008), al igual que al administrarlo con fentanilo, si bien en este caso aumenta el riesgo de apnea (Isitemiz y col., 2014). Se debe tener especial cuidado al administrar etomidato conjuntamente con bloqueantes neuromusculares no despolarizantes, ya que el etomidato puede potenciar los efectos de este tipo de fármacos (Posner, L.P., 2007).

El midazolam, administrado como preanestésico a una dosis de 0,03 mg/kg reduce a un 60% la aparición de mioclonías y al 17% si elevamos la dosis a 0,05 mg/kg, siendo por tanto dosis dependiente (Isitemiz y col., 2014). La combinación de midazolam (0,015 mg/kg) con fentanilo (0,5 µg/kg) también previene la aparición de mioclonías, pero se desconoce su mecanismo de acción íntimo, si bien estos fármacos son conocidos por inhibir la actividad neuronal subcortical en el sistema nervioso central, aunque sus acciones están mediadas por diferentes receptores (Isitemiz y col., 2014).

II.4.4.6.- Otros

Con frecuencia, durante la inducción y recuperación, se pueden presentar náuseas y vómitos (Ilkiw, J., 2002). Sin embargo, esto no suele ser un problema al utilizarse en los servicios de urgencias, ya que los pacientes a menudo permanecen intubados y sedados durante el tiempo suficiente para permitir el metabolismo y el aclaramiento del fármaco (Yeung y Zed, 2002).

La aparición de tromboflebitis y hemólisis de glóbulos rojos se han atribuido al disolvente propilenglicol. En tanto que la formulación que utiliza una emulsión lipídica como disolvente, reduce significativamente la incidencia de dolor en la inyección, tromboflebitis y hemólisis (Vanlersberghe y Camu, 2008).

No se observó con el etomidato una disminución en el porcentaje de saturación de oxígeno arterial en perros (Sams y col. 2008).

El etomidato inhibe el metabolismo de fármacos dependiente de citocromo oxidasa hepática P450 de una manera dependiente de la concentración, con valores de IC_{50} en el orden de los 10 µM. El grado mínimo de inhibición *in vivo* del metabolismo hepático puede retrasar la

eliminación de fármacos de bajo aclaramiento (diazepam, propranolol, carbamazepina, fenitoína), pero es poco probable que afecte a fármacos con elevado aclaramiento hepático, como opioides y ketamina (Vanlersberghe y Camu, 2008).

Se ha demostrado que las infusiones de etomidato reducen el flujo sanguíneo hepático porque inducen vasoconstricción de las arterias hepáticas. En pacientes con bajo volumen minuto y reducción de la perfusión hepática, la inactivación del etomidato puede estar retrasada. Sin embargo, gracias a la hidrólisis rápida por acción de las esterasas hepáticas y plasmáticas, este agente se puede utilizar en pacientes con hepatopatías (Maddison y col., 2004).

II.5.- Midazolam

II.5.1- Principio Activo

El midazolam es una benzodiacepina que tiene muy diversos usos en medicina humana y en medicina veterinaria. El término benzodiacepina se refiere a la porción en la estructura química de estos medicamentos, compuesto por un anillo de benceno unido a otro anillo de siete miembros heterocíclicos llamado diazepina (Figura II.5) (Gross, M. E., 2001).

Las primeras benzodiacepinas fueron sintetizadas en los años 50, pero el uso intravenoso de las mismas no comenzó hasta 1960, cuando se utilizó por primera vez diazepam por vía intravenosa para la inducción de la anestesia. Hasta la fecha, miles de diferentes benzodiacepinas se han sintetizado y alrededor de 30 de ellas están en uso clínico en varias partes del mundo. Sin embargo sólo cuatro (midazolam, diazepam, lorazepam y flumazenil) son ampliamente utilizados en la anestesia clínica (Olkola y Ahonen, 2008).

El midazolam fue sintetizado por primera vez en el año 1976. Es una imidazo-benzodiacepina hidrosoluble, en virtud de su estructura en anillo dependiente del pH. Con un pH inferior a 4 el anillo se abre y el fármaco se convierte en hidrosoluble. Con valores más elevados (como el fisiológico), el anillo se cierra y se torna muy liposoluble (Maddison y col., 2004).

Posee un p Ka de 6,2 y su peso molecular es de 325,8 daltons (Olkola y Ahonen, 2008). Concretamente su estructura química es 8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazol (1,5- α) (1,4) benzodiacepina (Figura II.5) (Maddison y col., 2004).

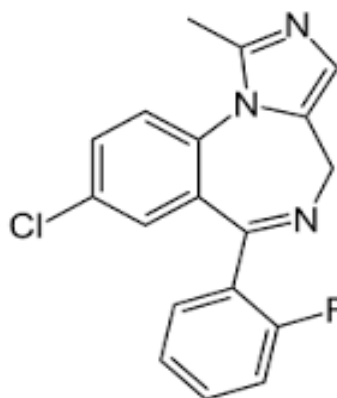


Figura II.5.- Estructura química del midazolam.

El midazolam puede administrarse por vía intramuscular, intravenosa, oral o intranasal. Las preparaciones comerciales, están neutralizadas a un pH ácido de 3,5 para asegurar su hidrosolubilidad. Por lo tanto, no requieren solventes irritantes y pueden administrarse por las vías intramuscular y endovenosa sin producir efectos colaterales, como dolor o flebitis (Maddison y col., 2004).

Se utiliza clínicamente como una sal de hidrocloruro (clorhidrato de midazolam) que es esencial para otorgarle las características fisicoquímicas antes mencionadas, deseables en las prácticas anestésicas (Olkkola y Ahonen, 2008).

II.5.2- Usos y mecanismo de acción

El midazolam, se caracteriza por su rápido inicio de acción, lo que permite su utilización, principalmente, como un agente de coinducción anestésica (Botana López, L. M., y col., 2002). Se utiliza esencialmente para la sedación en procedimientos de investigación o de cirugía menor, en la premedicación anestésica y para el mantenimiento de la sedación en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Olkkola y Ahonen, 2008).

Posee todas las propiedades características de las benzodiacepinas, se clasifica, fundamentalmente, como un fármaco ansiolítico y anticonvulsivante, aunque a dosis elevadas puede producir relajación muscular, sedación, amnesia e hipnosis (Figura II.6) (Gross, M. E., 2001; Maddison y col., 2004).

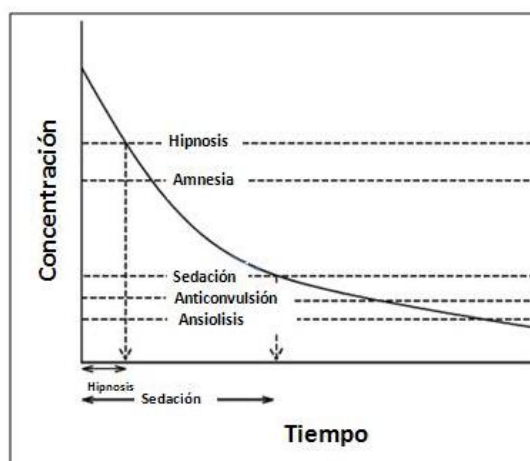


Figura II.6.- Representación esquemática de la relación entre la concentración de benzodiacepinas y los efectos clínicos.

Las benzodiacepinas actúan mediante la unión al sitio benzodiacepina modulador en el receptor que regula alostéricamente el canal de cloro postsináptico, produciendo una modulación positiva, aumentando la actividad del GABA y conduciendo a una depresión en la transmisión neuronal (Botana López y col., 2002).

En comparación con los barbitúricos, el propofol y los anestésicos inhalatorios, las benzodiacepinas no son capaces de producir el mismo grado de depresión neuronal. El efecto de las benzodiacepinas está claramente relacionado con la dosis, pero existe un efecto techo, donde el aumento de la dosis no aumenta el efecto y aunque pueden ser utilizadas como agentes hipnóticos durante la inducción de la anestesia intravenosa, no se adaptan de manera óptima para este propósito, ya que la inducción de sueño necesita dosis relativamente altas. Los efectos hipnóticos se producen a concentraciones mucho más altas que la amnesia y la sedación, por lo tanto la recuperación de todos los efectos tarda mucho tiempo debido a su baja velocidad de eliminación, lo cual es de vital importancia durante la recuperación anestésica. La recuperación anestésica es incluso más lenta si se utilizan benzodiacepinas también para el mantenimiento de la misma (Olkola y Ahonen, 2008).

Por lo que su utilidad se basa principalmente como agente preanestésico, ya que poseen: Efecto calmante y ansiolítico. Los animales no se muestran somnolientos, tienen menos ansiedad, pero se mantienen alerta. Las benzodiacepinas son muy seguras para su utilización en pacientes geriátricos o muy debilitados. Sin embargo, el midazolam cuando se administra sólo y a dosis media o alta, produce una sedación mínima e inclusive puede causar una excitación en perros y gatos, dificultando la inmovilización del paciente (McKelvey y Hollingshead, 2003).

Relajación de la musculatura esquelética. Producen una relajación musculoesquelética excelente y se utilizan con frecuencia para contrarrestar la rigidez muscular provocada por algunos agentes inductores (McKelvey y Hollingshead, 2003). Esta característica también puede tener indicaciones específicas como en el tratamiento del tétanos y el alivio del espasmo uretral (Maddison y col., 2004).

Actividad anticonvulsiva. Las benzodiacepinas se utilizan tanto en animales que padecen alteraciones convulsivas como, de manera preventiva, en aquellos animales que pueden presentar convulsiones en el período postanestésico (McKelvey y Hollingshead, 2003).

Se ha demostrado que el midazolam es tan eficaz como el diazepam intravenoso y más eficaz aún que el diazepam intrarrectal para controlar las convulsiones (Wolfe y Macfarlane, 2006).

La capacidad del midazolam para reducir la ansiedad y para proporcionar amnesia se ha demostrado de forma fiable en un intervalo de dosis administradas por diversas vías. El midazolam y otras benzodiacepinas producen efectos en la memoria anterógrada pero la memoria retrógrada no se ve afectada. La duración de la amnesia no es mucho mayor que la duración del procedimiento y el período de sedación o anestesia. La intensidad y la duración de la amnesia luego de la administración intravenosa de midazolam parece ser dependiente de la dosis, oscilando el período de duración entre 1 y 2 horas (Olkola y Ahonen, 2008).

Las benzodiacepinas estimulan el apetito en numerosas especies y esta propiedad ha demostrado ser beneficiosa en gatos anoréxicos (Maddison y col., 2004).

El midazolam se puede administrar conjuntamente con otros agentes preanestésicos. Es menos irritante para los tejidos que el diazepam y posee una mejor absorción cuando se administra por vía intramuscular. Sus efectos aparecen aproximadamente a los 3 minutos postinyección intramuscular (McKelvey y Hollingshead, 2003). No se aconseja su utilización como único agente para mantener una anestesia adecuada, por lo que debe ser combinado con otros agentes anestésicos (Gross, M. E., 2001).

Al no poseer efectos analgésicos, no debe ser utilizado para compensar un control insuficiente del dolor (Maddison y col., 2004).

La dosis recomendada en gatos y en perros como preanestésico, para producir sedación y decúbito lateral es de 0,045 - 0,2 mg/kg, por vía endovenosa o intramuscular. La dosis recomendada para infusión continua es de 0,2 mg/kg/h (Ilkiw y col., 1998; Gross, M. E., 2001; Maddison y col., 2004).

En situaciones en las que una vía intravenosa no está disponible, las benzodiacepinas administradas por vía intranasal ofrecen un método eficaz de administración; el midazolam administrado por vía intranasal a una dosis de 0,2 mg/kg se puede utilizar ya sea para producir una sedación leve como para el tratamiento de convulsiones generadas por ataques epilépticos (Wolfe y Braude, 2010).

El momento de administración del midazolam en combinación con ketamina, en diferentes horarios del día, puede afectar parcialmente la respuesta farmacológica en perros, debido a la posible influencia circadiana en la sensibilidad de los receptores del sistema nervioso

central este tipo de fármacos y en la velocidad de metabolización de la ketamina, el midazolam o ambos, según la hora del día en que se administren (Rebuelto y col., 2003).

Las benzodiacepinas potencian los efectos depresores de los barbitúricos y del propofol, lo cual permite reducir la dosis de estos agentes anestésicos durante la inducción. También incrementan los efectos de los analgésicos opioides sobre el sistema nervioso central (Maddison y col., 2004).

El desarrollo de la tolerancia a las benzodiacepinas parece ser un tema controvertido. Mientras que algunos autores han observado tolerancia, otros no han podido confirmar estos hallazgos. Además, se han sugerido diferentes mecanismos de tolerancia. Una explicación para la tolerancia es la disminución en la regulación del complejo receptor benzodiacepina-GABA_A. Sin embargo, Tietz y col. (1989) sugirieron que la exposición prolongada a las benzodiacepinas resulta en un efecto de alteración de los receptores agonistas de benzodiacepinas, sobre la relación concentración/respuesta del GABA (Olkola y Ahonen, 2008).

II.5.3- Farmacocinética

El midazolam es absorbido con rapidez y casi en forma completa (91%) luego de la inyección intramuscular (Plumb, D.C., 2006). Por vía oral, se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, en los seres humanos, y la concentración plasmática máxima se alcanza dentro de los 30 minutos (Altamimi y col., 2015), pero debido a un rápido efecto de primer paso, la biodisponibilidad decae a valores de entre 31 y 72 % (Plumb, D.C., 2006).

Las benzodiacepinas son fármacos lipofílicos y esto se refleja en su elevado volumen de distribución, que en el caso concreto del midazolam posee un valor de 3 L/kg. Lo cual le permite atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica y la placenta (Maddison y col., 2004).

Debido a su elevada lipofiliidad, el comienzo de la acción luego de su administración endovenosa es muy rápido, presentando, en pacientes humanos, la pérdida del reflejo de parpadeo o conteo a los 30 – 97 segundos postadministración (Plumb, D.C., 2006).

Posee una elevada unión a proteínas plasmáticas con valores superiores al 90 % en diversas especies (Maddison y col., 2004). Dado que sólo el fármaco libre penetra en el sistema nervioso central, los cambios en las concentraciones de proteínas plasmáticas o los cambios en la afinidad pueden alterar significativamente la respuesta a la dosis, lo que puede tener consecuencias en la práctica clínica (Plumb, D.C., 2006).

Las benzodiacepinas se metabolizan en el hígado a través de diversas vías, como desmetilación, hidroxilación y conjugación con ácido glucurónico (Maddison y col., 2004). Sin embargo, el midazolam también se metaboliza en sitios extrahepáticos. Esto ha sido demostrado por el descubrimiento de los metabolitos después de la inyección intravenosa de midazolam durante el período anhepático en los trasplantes de hígado (Olkola y Ahonen, 2008).

En función del metabolismo y aclaramiento plasmático se clasifica al midazolam como un fármaco de corta duración (Gross, M.E., 2001). La principal vía de metabolismo del midazolam es la oxidación, es degradado rápidamente en el hígado a dos metabolitos inactivos (1-OH- y 4-OH-midazolam), esta reacción es catalizada por el citocromo P-450 3A (CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7), la subfamilia más importante del citocromo P-450. La subfamilia CYP3A cataliza además, la biotransformación de una amplia variedad de sustancias exógenas y endógenas, y juega un papel significativo en el metabolismo de, aproximadamente, la mitad de los medicamentos disponibles (Kuroha y col., 2002; Altamimi y col., 2015). Ambos metabolitos se conjugan rápidamente por el ácido glucurónico para formar productos que han sido considerados farmacológicamente inactivos (Olkola y Ahonen, 2008).

El anillo de imidazol fusionado del midazolam se oxida más rápidamente que el grupo metileno del anillo de diazepina de otras benzodiazepinas, lo que representa una mayor velocidad de aclaramiento plasmático del midazolam, la cual va desde 0,348 L/kg.h hasta 0,54 L/kg.h en comparación con el diazepam (0,012-0,03 l/kg.h) y lorazepam (0,048-0,108 L/kg.h). En los hombres de edad avanzada, el aclaramiento del midazolam se reduce y la semivida de eliminación se prolonga en comparación con los hombres jóvenes. Entre las mujeres mayores y jóvenes sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el aclaramiento o en la semivida de eliminación (Olkola y Ahonen, 2008).

La edad avanzada no aumenta el volumen de distribución de manera significativa. En los pacientes obesos, el volumen de distribución se incrementa y la semivida de eliminación se prolonga, mientras que el aclaramiento se mantiene sin cambios. En los pacientes con cirrosis avanzada, el aclaramiento plasmático se reduce y la semivida de eliminación se prolonga en comparación con pacientes sanos, mientras que el volumen de distribución se mantiene sin cambios (Olkola y Ahonen, 2008).

La semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) del midazolam en perros, se ha estimado en 1,28 h. Los metabolitos conjugados se excretan principalmente en orina y sólo una pequeña proporción lo hace a través de la bilis (Maddison y col., 2004).

La curva de eliminación plasmática del midazolam puede ser instalada dentro de un modelo bi o tricompartmental, con una semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) en los seres humanos de 1,7 a 3,5 h., independientemente de la vía de administración utilizada. Cuando se administra a través de infusiones continuas, el midazolam posee una semivida de eliminación más rápida que el diazepam y más lenta que otros agentes anestésicos, como el propofol o el etomidato (Fig. II.7) (Olkola y Ahonen, 2008).

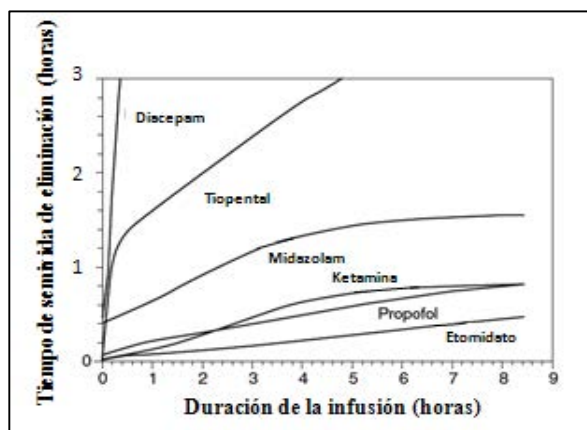


Fig. II.7.- Semivida de eliminación para agentes anestésicos intravenosos utilizados en infusiones continuas (Olkola y Ahonen, 2008).

Las concentraciones plasmáticas de midazolam se ven fuertemente influidas por el estado del paciente. Tanto en niños críticamente enfermos o recién nacidos, como en adultos críticamente enfermos frente a sanos, el aclaramiento del midazolam y sus concentraciones plasmáticas son muy variables; de hasta 40 veces las concentraciones plasmáticas (con variaciones de tan solo 2,5 veces la dosis) en niños, o 12 a 20 veces para el aclaramiento en adultos. Esto se puede explicar por la afectación que sufre el hígado en casos de shock e hipoxia. Los mediadores inflamatorios tales como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factores de necrosis tumoral (NTF) y el interferón (INF) pueden tener también un efecto negativo sobre el metabolismo del fármaco. La ventilación mecánica utilizada en los pacientes críticos puede, además, reducir el gasto cardíaco y por tanto, reducir el flujo de sangre a los órganos, especialmente al hígado y a los riñones, que son los responsables de la eliminación del fármaco (Altamimi y col., 2015).

El midazolam es susceptible a interactuar con otros fármacos que afectan el CYP3A4. Los inductores de CYP3A4 causan un profundo aumento en su tiempo de eliminación. Infusiones a largo plazo de midazolam a pacientes que reciben estos inhibidores, por ejemplo, durante el tratamiento de cuidados intensivos, puede resultar en un aumento indeseable en la duración de los efectos hipnóticos, si la dosis no se valora de acuerdo con el efecto. El propofol, utilizado para la inducción y mantenimiento de la anestesia, disminuye el aclaramiento del midazolam administrado por vía intravenosa en un 37%, por la inhibición del CYP3A4 hepático (Hamaoka y col., 1999).

El ketoconazol puede inhibir competitivamente la hidroxilación catalizada por CYP3A del midazolam. En perros y en gatos, el tratamiento con ketoconazol afecta evidentemente la farmacocinética del midazolam. El aclaramiento corporal total del midazolam administrado por vía endovenosa, se reduce en menos de un tercio en los animales que reciben ketoconazol por vía oral (Sasaki y Shimoda, 2015). Kukanich y Hubin, M. (2010) demostraron que el tratamiento de 5 días con ketoconazol oral a 12,25 mg/kg aumenta el tiempo de residencia media (MRT) del midazolam aproximadamente al doble, después de la inyección intravenosa.

El diltiazem, también inhibe el CYP3A4 hepático. Estudios realizados en seres humanos sometidos a cirugía de revascularización coronaria y en pacientes en cuidados intensivos, demostraron que el diltiazem aumentó el área bajo la curva (AUC) del midazolam en un 25%. El retardo en la eliminación del midazolam se reflejó también en las variables farmacodinámicas, ya que los pacientes que recibieron diltiazem fueron extubados en un promedio, 2,5 horas más tarde de los que no lo recibieron (Ahonen y col., 1996).

Puesto que los inhibidores del CYP3A4 hepático reducen el metabolismo de primer paso y la eliminación, la farmacocinética del midazolam se ve más afectada cuando es administrado por vía oral con respecto al administrado por vía intravenosa. Diversos estudios han demostrado que los inhibidores del CYP3A4 hepático, pueden causar hasta un aumento de diez veces en el AUC del midazolam (Olkola y Ahonen, 2008).

Estudios farmacocinéticos en ratones, han informado que la semivida de eliminación del midazolam posee influencia circadiana, resultando ser más corta a las 14:00 h (fase de reposo), y más larga a las 02:00 h (fase de actividad). Siendo diversos mecanismos multifactoriales, los responsables de estas variaciones circadianas. En estudios realizados con seres humanos, no se observaron cambios circadianos significativos en los procesos de absorción y distribución o en las semividas de eliminación del midazolam, mientras que el aclaramiento plasmático total fue menor durante la mañana (0,317 l/kg.h) que durante la noche (0,463 l/kg.h) (Chassard y Bruguerolle, 2004).

II.5.4.- Efectos farmacológicos sobre los órganos y sistemas

II.5.4.1.- Sistema cardiovascular

A dosis terapéuticas, las benzodiacepinas ejercen mínimos efectos cardiovasculares, con una leve disminución de la presión arterial, estas características las hace particularmente útiles para anestesiarse pacientes geriátricos y de alto riesgo (McKelvey y Hollingshead, 2003). Sin embargo a dosis elevadas causan reducciones en la presión arterial y en el volumen minuto. Estos cambios se deben principalmente a una disminución de la resistencia vascular sistémica (Maddison y col., 2004).

El midazolam y el diazepam también han demostrado deprimir el barorreflejo. Este hecho significa que tanto el midazolam como el diazepam inducen una capacidad limitada para compensar posibles alteraciones hemodinámicas relacionadas con hipovolemia (Olkola y Ahonen, 2008).

El midazolam se ha utilizado en infusión intravenosa continua en combinación con un agente volátil suplementario o como único agente hipnótico en cirugías cardíacas. A menudo, infusiones continuas de midazolam se administran a pacientes de cuidados intensivos para mantener la sedación durante la ventilación mecánica (Olkola y Ahonen, 2008). Aunque como

vimos anteriormente, esto puede alterar considerablemente las concentraciones plasmáticas de midazolam (Altamimi y col., 2015).

Se investigó la estabilidad hemodinámica asociada a la inducción anestésica con midazolam en combinación con un agente opioide en pacientes humanos programados para cirugías de bypass cardíaco o cirugías cardíacas valvulares. Los resultados encontrados en los pacientes en los cuales la inducción de la anestesia se realizó utilizando midazolam combinado con fentanilo o remifentanilo, se tradujeron en una disminución significativa de la frecuencia cardíaca, la presión arterial media y el índice de resistencia vascular sistémica. Aunque el ritmo cardíaco volvió a la línea basal después de la intubación traqueal, la presión arterial media y el índice de resistencia vascular sistémica se mantuvieron muy por debajo de los valores basales hasta 10 minutos después de la intubación traqueal (Budde y Mets, 2013).

II.5.4.2.- Sistema Respiratorio

Las benzodiacepinas administradas a dosis elevadas, afectan a la respiración de dos maneras diferentes. Primero, tienen un efecto negativo sobre el tono muscular, lo que conduce a un aumento del riesgo de obstrucción de la vía aérea superior (Norton y col., 2006); por lo tanto, no se recomiendan y se consideran incluso fármacos contraindicados en pacientes que sufren de apnea obstructiva del sueño. En segundo lugar, un factor importante que contribuye al efecto depresor ventilatorio de las benzodiacepinas es su capacidad para deprimir la respuesta a la hipoxia en condiciones de hipercapnia, ya que producen un enlentecimiento de la respuesta ventilatoria ante un aumento en la presión arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) (Olkola y Ahonen, 2008).

El midazolam y el diazepam, disminuyen la respuesta neuronal del cuerpo carotideo a la hipoxia, mediante el aumento de la actividad inhibitoria del receptor GABA_A en el sistema de control respiratorio (cuerpo carotideo y ganglio petroso). Esto quedó demostrado ya que con la aplicación continua de bicuculina, un antagonista de los receptores GABA_A , se abolieron los efectos inhibidores que ejercen las benzodiacepinas en el sistema de control respiratorio (Igarashi y col., 2009).

Una reacción típica a las benzodiacepinas es, además, una disminución en el volumen corriente, por lo que si se administran benzodiacepinas conjuntamente con un opióide, se incrementa notablemente el riesgo de depresión respiratoria clínicamente significativa (Tverskoy y col., 1989). Sin embargo, un estudio reciente realizado en perros, confirmó que una disminución en el volumen corriente de la ventilación es bien tolerada en perros sanos (Oura y col., 2012).

II.5.4.3.- Sistema Nervioso Central

Las benzodiacepinas pueden modificar el comportamiento en personas y animales. En el sistema nervioso central actúan como ansiolíticos, anticonvulsivantes e hipnóticos. Al igual que la mayoría de los agentes psicótropos, producen efectos secundarios no relacionados con sus efectos terapéuticos, como puede ser la ataxia (Gross, M. E., 2001).

Las benzodiacepinas reducen el metabolismo cerebral ($CMRO_2$) y el flujo sanguíneo cerebral (CBF) sin perturbar la normal relación CBF/ $CMRO_2$ (Olkola y Ahonen, 2008).

En el tratamiento de convulsiones provocadas por ataques epilépticos agudos, al ser administrado por la vía intranasal permite una sencilla, segura y eficaz opción para el tratamiento de convulsiones prolongadas, sin evidencia de compromiso respiratorio. La medicación antiepiléptica alcanza directamente a la sangre a través de la mucosa nasal, llegando rápidamente al líquido cefalorraquídeo y proporcionando un mejor control de las crisis epilépticas que el diazepam administrado por vía intrarrectal, en aquellos pacientes en los cuales es imposible acceder a una vía intravenosa rápidamente (Wolfe y Macfarlane, 2006).

Hay algunas pruebas realizadas en roedores, utilizados como animales de experimentación, sobre los efectos neuroprotectores que las benzodiacepinas tendrían en el cerebro. Sin embargo, los estudios realizados en otros animales no han podido confirmar la utilidad de las benzodiacepinas en la neuroprotección y no hay evidencias científicas de que tengan efectos neuroprotectores en los seres humanos (Olkola y Ahonen, 2008).

Todas las benzodiacepinas actúan sobre el sistema nervioso central e interactúan además, con otros fármacos que también ejercen sus efectos sobre el sistema nervioso central. Cuando la interacción entre la morfina y el midazolam se cuantifica por su efecto sedante, los efectos de estos dos fármacos se consideran aditivos (Olkola y Ahonen, 2008). Sin embargo, las interacciones entre las benzodiacepinas y los opiáceos en general, son consideradas sinérgicas. La interacción propofol-midazolam-alfentanilo produce un profundo sinergismo hipnótico, al igual que la combinación midazolam-alfentanilo (Vinik y col., 1994).

III.- Objetivos e hipótesis

III.1.- Objetivo general

- Contribuir al conocimiento del comportamiento cronobiológico de los fármacos anestésicos en animales domésticos y de las diferentes variaciones cronobiológicas en la hemodinamia de animales anestesiados.

III.2.- Objetivos Particulares

- Evaluar la influencia de los ritmos biológicos en el comportamiento farmacodinámico de la combinación anestésica etomidato-midazolam en perros y gatos.
- Evaluar las variaciones hemodinámicas provocadas por el uso de la combinación anestésica de etomidato-midazolam en perros y gatos.
- Evaluar la influencia de la cronobiología sobre las variaciones hemodinámicas provocadas por la combinación anestésica de etomidato-midazolam.

III.3.- Hipótesis

- Los ritmos biológicos influyen sobre el comportamiento farmacológico de la combinación etomidato-midazolam utilizada en la anestesia de perros y gatos.
- La combinación etomidato-midazolam produce modificaciones cronobiológicas en parámetros hemodinámicos de perros y gatos.
- Las variaciones de los parámetros hemodinámicos provocadas por el uso de la combinación anestésica de etomidato-midazolam están influenciadas por los ritmos biológicos en perros y gatos.

IV.- Materiales y Métodos

IV.1.- Materiales

IV.1.1.- Animales

El estudio se realizó sobre 8 felinos hembras, mestizas, adultas, con un peso de 2,8 a 4,8 Kg, a quienes referiremos en adelante como “gatas” y 8 caninos hembras, mestizas, adultas, con un peso de 8 a 18 Kg, a quienes referiremos en adelante como “perras”. Los animales eran propiedad de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba. Los datos de cada animal se reflejan en las tablas IV.1 y IV.2, los valores correspondientes a edad y peso son los que presentaban los animales al inicio de la experimentación. Durante el transcurso del estudio los datos referentes al peso de cada animal se actualizaban al momento de administrar los fármacos, a fin de aplicar la dosis correcta de los mismos.

Tabla IV.1.- Datos de los felinos que formaron parte del estudio

Felinos				
Animal	Identificación	Sexo	Edad (años)	Peso (kg)
I	g1	H	6	3,8
II	g2	H	2,5	3,2
III	g3	H	5,5	2,9
IV	g4	H	3	3,3
V	g5	H	5,5	2,9
VI	g6	H	2	3,2
VII	g7	H	7,5	2,8
VIII	g8	H	6,5	4,8

Tabla IV.2.- Datos de los caninos que formaron parte del estudio

Caninos				
Animal	Identificación	Sexo	Edad (años)	Peso (kg)
I	p1	H	2	13
II	p2	H	2,5	14
III	p3	H	3,5	18
IV	p4	H	2	11
V	p5	H	3	12
VI	p6	H	3,5	12
VII	p7	H	2	8
VIII	p8	H	2,5	15

IV.1.2.- Fármacos utilizados

Midazolam: La sustancia patrón fue suministrada por el laboratorio de especialidades veterinarias Richmond®, Argentina, lote 8589. La especialidad farmacéutica utilizada para las pruebas fue Midazolam® 0,5 % solución inyectable (Richmond®, lote 033)

Etomidato: La sustancia patrón fue suministrada por el laboratorio de especialidades veterinarias B/Braun, Alemania, código 3644294. La especialidad farmacéutica utilizada para las pruebas fue Etomidato-Lipuro® 0,2 % en emulsión lipídica de aceite de soja, triglicéridos de cadena media, glicerol, lecitina de huevo, oleato sódico y agua (Etomidato®, lotes 8502C33, 0185C33 y 13315034)

IV.1.3.- Materiales utilizados durante la administración de los fármacos

- Agujas estériles desechables (0.8 x 25 mm 21 G x 1", Neojet®).
- Alcohol etílico 96° (Porta®).
- Algodón hidrófilo.
- Solución fisiológica estéril de Cl Na 0,9 % (Rivero®).
- Perfus de administración de fluidos de Macrogoteo estériles (BD®).
- Catéter de administración endovenosa de 22 G y 24 G (Jelco®).
- Guantes de látex (Aurelia®).
- Jeringas estériles desechables 1 ml (np®).
- Jeringas estériles desechables 3 ml (np®).
- Jeringas estériles desechables 10 ml (np®).
- Peladora (Oster® Golden A5. 5-55H).

IV.1.4.-Equipos utilizados en la evaluación de los parámetros hemodinámicos

- Monitor multiparamétrico para evaluación de saturación de oxígeno arterial (Oximetría de pulso) marca FEAS ELECTRÓNICA®, modelo MULTIPAR.
- Monitor de presión sanguínea no invasiva marca FEAS ELECTRÓNICA®, modelo 8000.
- Electrocardiógrafo marca DONGJIANG®, modelo ECG-11B.

IV.1.5.- Instrumentación para el análisis de los datos

- Hoja de cálculo Microsoft® Excel 2007.
- Impresora X1250 (Lexmark®).
- Microsoft® Windows 7.
- Ordenador (HP® Compaq 8510p con procesador Intel Centrino®).
- Procesador de texto Microsoft® Word 2007.

- Programa de tratamiento estadístico InfoStat® 2011.
- Programa de tratamiento cronobiológico Cosinor 2.4 SEPTMR®.

IV.2.- Métodos

IV.2.1.-Acondicionamiento y mantenimiento de los animales

Los animales utilizados eran propiedad de la Universidad Católica de Córdoba (UCC) Argentina, donde se llevaron a cabo los experimentos, por lo que no fue necesario un periodo de aclimatación. Los animales estaban alojados en gatiles y caniles en la Universidad Católica de Córdoba, en la ciudad de Córdoba, Argentina (31° 25' latitud sur, 64° 11' longitud oeste) expuestos a un fotoperiodo natural.

Los gatiles y caniles seguían las normas internacionales para el bienestar animal (Cardozo de Martínez y col., 2007).

Tres meses antes de iniciar las pruebas se controló que no se les suministrara ningún tratamiento o fueran sometidos a ninguna práctica que pudiera interferir con el desarrollo de la experimentación. Dos meses antes de iniciarse la experimentación fueron vacunados con el plan sanitario completo y desparasitados. Las pruebas fueron autorizadas por el comité de bioética de la Universidad Católica de Córdoba.

La sala en la cual se realizaron los procedimientos contaba con temperatura constante de entre 22° y 24° C, acondicionada a través de un acondicionador de aire frío-calor.

IV.2.2.- Criterios de inclusión

Los animales seleccionados siguiendo el criterio de hembras no gestantes, tamaño uniforme, mansedumbre, estado corporal y clínicamente sanas, fueron separados del resto del grupo y alojados en instalaciones acordes para cada especie (caniles y gatiles) separados entre sí, para facilitar su manejo y evitar situaciones de estrés. Fueron alimentados con alimento balanceado (Royal Canin® Size Health Nutrition) ejercitados en horarios regulares dos veces por día y con provisión de agua *ad libitum*.

Los animales fueron divididos al azar en 4 grupos de 2 ejemplares cada uno.

Previo al comienzo del estudio, todos fueron sometidos a exámenes clínicos y analíticas sanguíneas para verificar su estado de salud y comprobar la ausencia de patologías; también se les realizaron exámenes ecográficos para comprobar la ausencia de preñez.

Todos los animales fueron controlados clínicamente de manera periódica, a fin de asegurar un correcto estado de salud y ausencias de patologías durante el tiempo en que transcurrió el experimento.

- ***IV.2.2.1.- Examen físico general***

Se realizó una inspección visual del estado general de los animales (estado del aparato músculo-esquelético, manto y capa, posibles taras o defectos, etc.). Se estudiaron parámetros como la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y auscultación de vías respiratorias, temperatura rectal, estado aparente de las mucosas y tiempo de llenado capilar.

- ***IV.2.2.2.- Analítica sanguínea***

Estos controles sanitarios se realizaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Veterinario de la Universidad Católica de Córdoba. Las muestras de sangre se enviaron a dicho laboratorio inmediatamente después de ser extraídas.

- ***IV.2.2.2.1.- Análisis hematológicos:*** Se recogieron muestras sanguíneas de 1 ml en viales conteniendo EDTA como anticoagulante. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- Hematocrito.
- Hemoglobina.
- Eritrocitos.
- Leucocitos.
- Neutrófilos en banda.
- Neutrófilos segmentados.
- Eosinófilos.
- Basófilos.
- Linfocitos.
- Monocitos.
- Plaquetas.

- ***IV.2.2.2.2.- Bioquímica sanguínea:*** Se recogieron 2 ml de sangre en viales sin anticoagulante. Los valores estudiados fueron:

- Creatinina.
- Urea.
- GOT.
- GPT.
- FAS.
- Proteínas Totales.

IV.2.3.- Diseño de la experiencia

La experiencia se desarrolló durante los meses de agosto de 2012 y febrero de 2013 en los felinos y durante los meses de agosto de 2013 y febrero de 2014 en los caninos, invierno y verano, respectivamente, en el hemisferio sur.

El mes de agosto posee una temperatura media mensual de 11.5°C (Lovera, E. y col., 2012), con una humedad relativa promedio del 60 % (SIGA, 2012) y 11 horas medias de luz solar al día.

El mes de febrero posee una temperatura media mensual de 22.1°C (Lovera, E. y col., 2012), con una humedad relativa promedio del 76 % (SIGA, 2012) y 13 horas medias de luz solar al día.

Las ocho perras y las ocho gatas recibieron la combinación de etomidato-midazolam por vía endovenosa (i.v.) en 4 horarios diferentes del día (02, 08, 14, y 20 hs), en dos estaciones extremas del año (invierno y verano) a razón de un tratamiento por semana, en un estudio aleatorio de diseño cruzado.

Se determinaron los valores correspondientes a la frecuencia cardíaca previa a la administración de los fármacos (preinducción) y a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos.

Se determinaron los valores correspondientes a presión arterial diastólica, presión arterial media, presión arterial sistólica y saturación de oxígeno arterial (SpO₂) a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos.

Tabla IV-3 Esquema utilizado para la evaluación de los animales que participaron en el estudio siguiendo un diseño cruzado

Hora de administración	8:00	14:00	20:00	2:00
Semana	Animal			
1°	I y II	III y IV	V y VI	VII y VIII
2°	III y IV	I y II	VII y VIII	V y VI
3°	V y VI	VII y VIII	I y II	III y IV
4°	VII y VIII	V y VI	III y IV	I y II

El mismo protocolo se repitió en invierno y en verano.

IV.2.4.- Protocolo anestésico

A cada animal se le colocó un catéter en la vena cefálica antebraquial del miembro anterior derecho, a través del cual se administró una dosis de 0,1 mg/kg I.V. de Midazolam® en bolo, pasado 1 minuto se administraron 3 mg/kg I.V. de Etomidato-Lipuro® en bolo y una solución fisiológica estéril de cloruro de sodio al 0,9 % isotónico fue administrado en el mismo catéter a una velocidad de 5 ml/kg/h.

IV.2.5.- Observación de la respuesta farmacológica

La duración, en minutos, de cada secuencia de la respuesta farmacológica se determinó mediante la observación visual de cada animal desde el momento de la administración del tratamiento, definido como t0. Un mismo observador registró la aparición y la duración de los siguientes efectos:

- ***Tiempo de inducción:*** Determinado desde la administración de los fármacos hasta la pérdida del reflejo de retirada podal (determinado en los dedos de los 4 miembros)
- ***Tiempo de inmovilización:*** Determinado desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de retirada podal en los 4 miembros.
- ***Tiempo de recuperación:*** Determinado desde la recuperación de reflejo de retirada podal en los 4 miembros, hasta recuperar una posición de pie controlado (no inferior a 2 minutos de marcha normal).
- ***Duración de la respuesta total:*** Determinada desde la administración de los fármacos hasta la recuperación de una posición de pie controlado (no menor a 2 minutos de marcha normal).

IV.2.6.- Registro de parámetros hemodinámicos

En el período preanestésico se registró la frecuencia cardíaca (FC). Durante el período anestésico se registraron: frecuencia cardíaca (FC), presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y presión arterial sistólica (PAS) y saturación de oxígeno arterial (SpO₂).

Los mismos parámetros fueron medidos en los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos.

Cardioscopia: El electrocardiograma se monitoreó en derivada DII, mediante un cardioscopio a partir del cual se determinó la frecuencia cardíaca

Presión arterial: Las presiones arteriales diastólicas, medias y sistólicas se registraron mediante un medidor de tipo oscilométrico no invasivo.

Oximetría: La saturación de oxígeno arterial (SpO₂) se evaluó mediante un oxímetro de pulso colocado en el tercio medio de la lengua del paciente.

Durante la experiencia se mantuvo una vía de acceso endovenoso permeable mediante un catéter intravenoso ubicado en la vena cefálica antebraquial derecha, el cual se irrigó con una solución fisiológica estéril de Cloruro de Sodio al 0,9 % isotónico (5 ml/kg/h).

Los tratamientos fueron realizados siempre por el mismo operador. Durante todo el procedimiento se evitó el sufrimiento innecesario de los animales. La aparición de eventuales efectos colaterales fue registrada.

IV.2.7.- Criterios de exclusión

No se registraron casos en los cuales algún animal no hubiese cumplido con los parámetros clínicos establecidos en cuanto a hembras no gestantes, tamaño uniforme, mansedumbre, estado corporal, ausencia de patologías o alteraciones significativas en los análisis hematológicos y bioquímica sanguínea.

En los casos en los cuales se registró una saturación de oxígeno arterial (SpO₂) menor a 92% se suministro oxígeno medicinal al 99% a través de una máscara de oxigenación.

IV.2.8.- Tratamiento estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como media aritmética, corregida por una medida de dispersión (desviación estándar).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat® para Windows (Di Rienzo, J.A. y col., 2011).

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes:

- Los datos cuantitativos correspondientes a la duración del efecto en cada fase y a la variación en los valores de los parámetros hemodinámicos fueron analizados por ANOVA de los cuadrados mínimos usando un modelo general lineal.
- El nivel de significación fue de $p \leq 0,05$.
- Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro Wilk.

V.- Resultados

V.1.- Gatas

V.1.1.- Examen clínico y analítica sanguínea de las gatas

El examen clínico, los análisis hematológicos (Tabla V.1) y de bioquímica sanguínea (Tabla V.2) realizados a las gatas con antelación al comienzo del estudio, pusieron de manifiesto el correcto estado de salud de los animales (véase Anexo I). Durante el tiempo en que transcurrió el estudio no se observaron signos clínicos de alteración de dicho estado. Tampoco se observó inflamación o manifestaciones de dolor tras la administración de los fármacos a estudiar, por vía endovenosa.

Tabla V.1: Hematología previa al comienzo del estudio en las gatas y sus correspondientes valores de referencia

Gatas											
Animal	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Eritrocitos (millones/mm ³)	Leucocitos (miles/mm ³)	Neutrófilos en banda (%)	Neutrófilos segmentados (%)	Eosinófilos (%)	Linfocitos (%)	Basófilos (%)	Monocitos (%)	Plaquetas (miles/mm ³)
g1	33	10,3	5,5	9,6	0	62	1	36	0	1	320
g2	38	11,3	6,3	9,4	0	68	3	26	0	3	360
g3	40	12,6	5,8	6,3	0	71	3	22	0	4	240
g4	35	11,9	5,9	8,7	0	65	2	29	0	4	410
g5	37	12,5	6,2	7,5	0	74	1	20	0	5	430
g6	39	13,2	5,7	10,6	0	64	3	31	0	2	350
g7	36	11,8	6,3	8,4	0	72	2	24	0	2	280
g8	34	12,4	5,6	9,4	0	65	2	30	0	3	420
Referencias*	28 a 45	8 a 15	5 a 10	5,5 a 19,5	0 a 3	37 a 75	2 a 12	20 a 55	0 a 1	1 a 4	300 a 800

*Benjamín, M.M., 1984; Willard, M.D., 1993; Meyer y Harvey, 1999.

Tabla V.2: Bioquímica sanguínea previa al comienzo del estudio en las gatas y sus correspondientes valores de referencia

Gatas						
Animal	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	FAS (U/L)	Proteínas Totales (g/dl)
g1	1,3	32	56	55	260	5,8
g2	0,9	36	47	64	115	6,2
g3	0,84	40	53	51	154	5,8
g4	0,65	38	57	62	90	6,1
g5	0,74	29	41	71	150	5,7
g6	0,95	33	26	35	110	6,3
g7	0,65	27	36	47	96	6
g8	0,87	36	35	41	85	5,9
Referencias*	Hasta 1,5	30 a 60	Hasta 70	Hasta 80	Hasta 380	5,6 a 7,8

*Benjamín, M.M., 1984; Willard, M.D., 1993; Meyer y Harvey, 1999.

V.1.2.- Resultados de los parámetros anestésicos en gatas

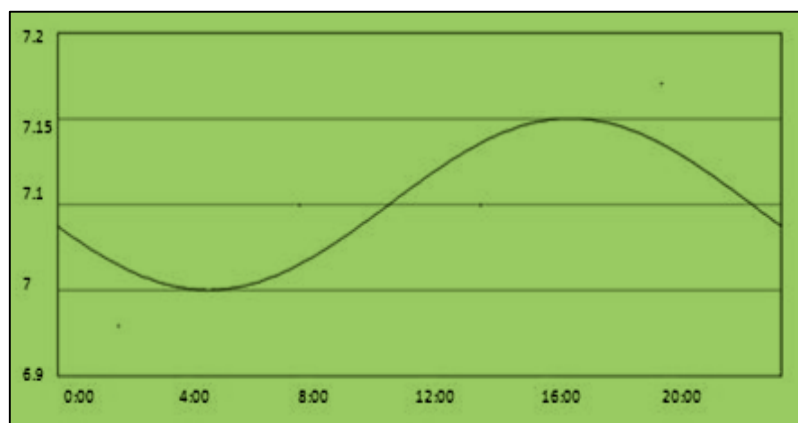
V.1.2.1.- Horarios de invierno

V.1.2.1.1.- Tiempo de inducción

En la tabla V.3 se reflejan los tiempos transcurridos desde la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato hasta la pérdida del reflejo de retirada podal, determinando la duración del tiempo de inducción anestésica, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.1, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase

Tabla V.3: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inducción, expresados en segundos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Segundos			
g1	7,8	7,3	7,7	7,2
g2	6,6	8	7,2	6,4
g3	7,7	7	7,4	8,1
g4	6,5	6,7	7,3	7
g5	7,3	7,3	7,6	7,7
g6	6,5	6,4	6,1	6,5
g7	7,6	7,2	6,3	7,1
g8	6,7	7,1	7,4	7,5



MESOR: 7.1
Acrofase: 255° (17:00)

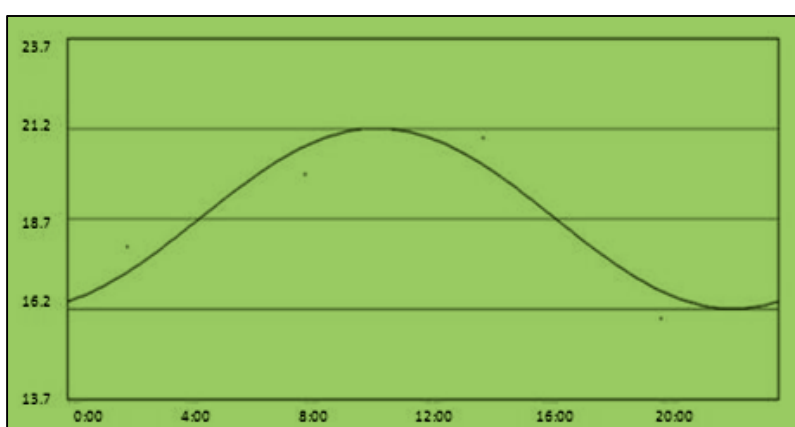
Gráfico V. 1. Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inducción, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.2.1.2.- Tiempo de inmovilización

En la tabla V.4 se reflejan los tiempos en que permanecieron inmóviles las gatas (determinado desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de retirada podal en los 4 miembros), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.2, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.4: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inmovilización, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Minutos			
g1	19	20	23	22
g2	20	24	27	18
g3	13	17	14	15
g4	13	15	17	16
g5	20	23	29	13
g6	21	27	26	21
g7	18	16	18	14
g8	21	16	15	12



MESOR: 18.7
Acrofase: 156° (10:27)

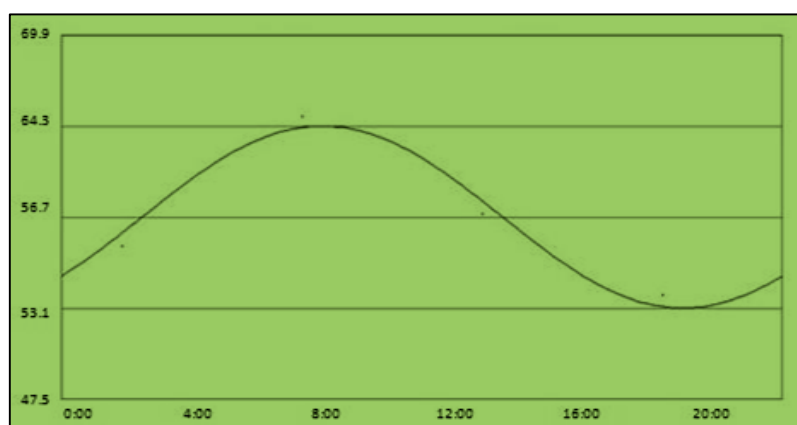
Gráfico V.2 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inmovilización, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.2.1.3.- Tiempo de recuperación

En la tabla V.5 se reflejan los tiempos que requirieron las gatas para recuperarse (determinado desde la recuperación de reflejo de retirada podal en los 4 miembros, hasta recuperar una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.3, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.5: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de recuperación, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Minutos			
g1	49	75	55	55
g2	63	83	57	57
g3	60	53	58	50
g4	66	69	68	54
g5	76	80	49	53
g6	54	55	70	63
g7	43	51	59	50
g8	45	55	58	47



MESOR: 58.7
Acrofase: 130° (8:41)

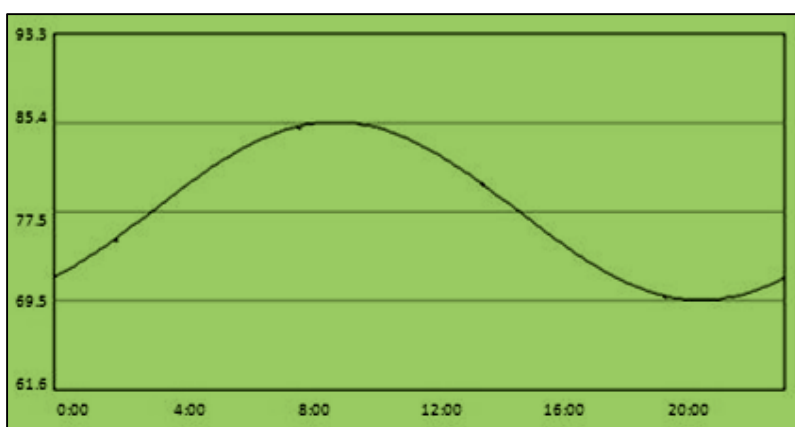
Gráfico V.3 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de recuperación, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.2.1.4.- Tiempo de respuesta total

En la tabla V.6 se reflejan los tiempos de respuesta total de las gatas (determinado desde la administración de los fármacos hasta la recuperación de una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.4, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.6: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de respuesta total, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Minutos			
g1	68	95	78	77
g2	83	107	84	75
g3	73	70	72	65
g4	79	84	86	70
g5	96	103	78	66
g6	75	82	96	84
g7	61	67	77	64
g8	66	71	73	59



MESOR: 77.5
Acrofase: 138° (9:13)

Gráfico V.4 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de respuesta total, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

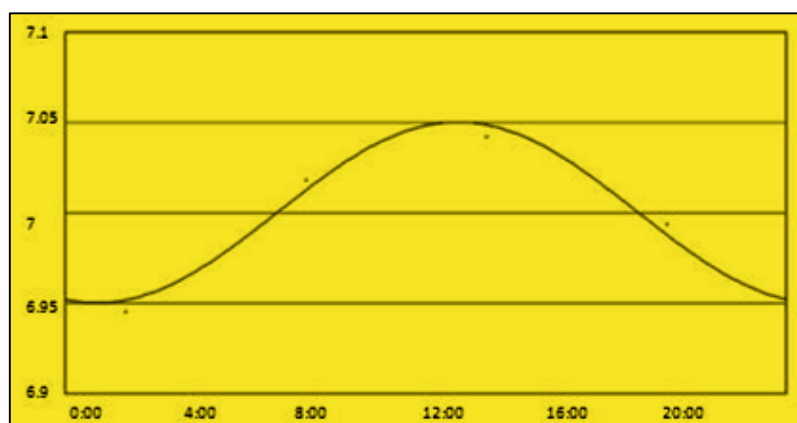
V.1.2.2.- Horarios de verano

V.1.2.2.1.- Tiempo de inducción

En la tabla V.7 se muestran los tiempos transcurridos desde la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato hasta la pérdida del reflejo de retirada podal, determinando la duración del tiempo de inducción anestésica, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.5, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.7: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inducción, expresados en segundos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Segundos			
g1	7,2	7,1	8	7,1
g2	6	7,3	7,2	6,1
g3	7,8	7	8,1	7,7
g4	6,6	6,5	7	7,3
g5	7,9	7,4	6,5	7,9
g6	6,5	6,1	6,1	6,7
g7	7	7,3	6,4	6
g8	6,4	7,6	7,3	7,2



MESOR: 7
Acrofase: 195° (13:30)

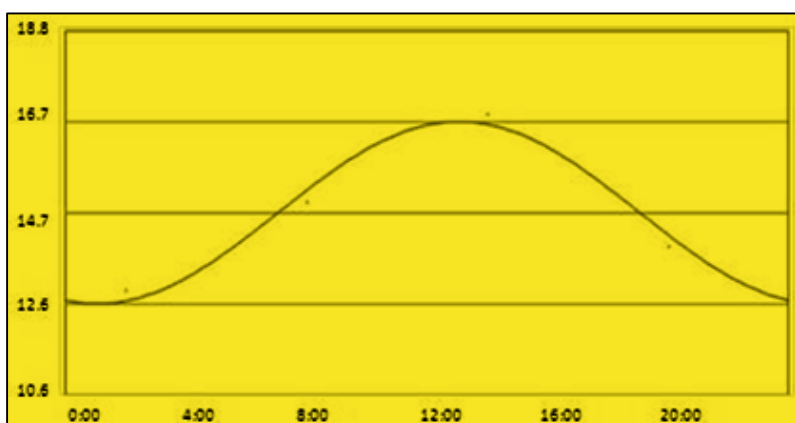
Gráfico V.5 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inducción, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.2.2.2.- Tiempo de inmovilización

En la tabla V.8 se reflejan los tiempos de inmovilización de las gatas (determinado desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de retirada podal en los 4 miembros), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.6, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.8: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inmovilización, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Minutos			
g1	19	16	17	19
g2	13	14	15	15
g3	12	14	17	10
g4	18	13	23	11
g5	10	17	14	16
g6	10	20	16	13
g7	15	13	22	15
g8	10	11	18	14



MESOR: 14.7
Acrofase: 195° (13:30)

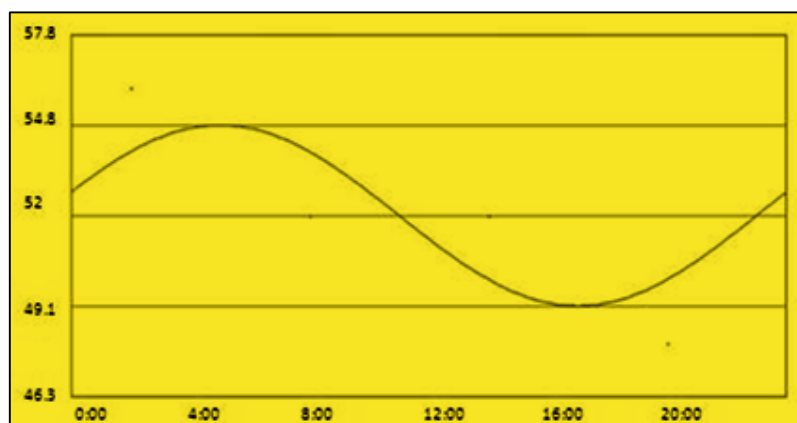
Gráfico V.6 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inmovilización, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.2.2.3.- Tiempo de recuperación

En la tabla V.9 se reflejan los tiempos que requirieron las gatas para recuperarse (determinado desde la recuperación de reflejo de retirada podal en los 4 miembros, hasta recuperar una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.7, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.9: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de Recuperación, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Minutos			
g1	65	51	78	55
g2	52	48	41	33
g3	62	47	45	55
g4	59	46	55	52
g5	50	47	56	47
g6	52	46	46	46
g7	58	68	52	42
g8	50	67	45	58



MESOR: 52
Acrofase: 75° (5:00)

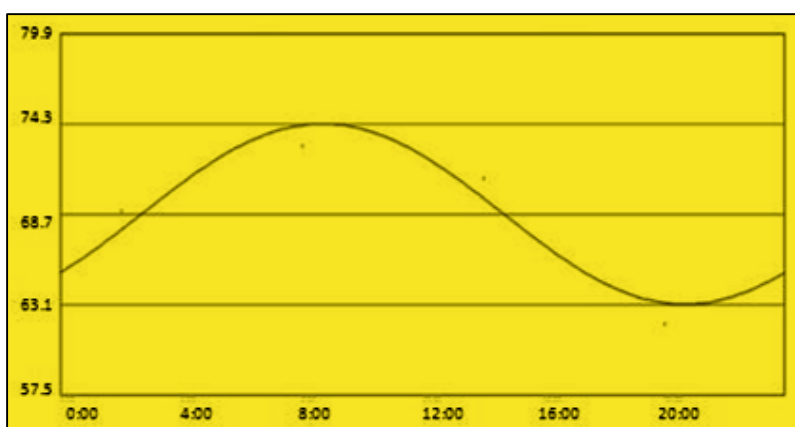
Gráfico V.7. Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de recuperación, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.2.2.4.- Tiempo de respuesta total

En la tabla V.10 se reflejan los tiempos de respuesta total de las gatas (determinado desde la administración de los fármacos hasta la recuperación de una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.8, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.10: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de respuesta total, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Gata	Minutos			
g1	84	96	95	74
g2	65	69	65	48
g3	74	64	62	65
g4	77	63	78	63
g5	60	68	70	63
g6	62	68	62	59
g7	73	81	74	57
g8	60	78	63	72



MESOR: 68.7
Acrofase: 130° (8:41)

Gráfico V.8 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de respuesta total, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.2.3- Análisis estadísticos de los parámetros anestésicos en gatas entre los horarios de invierno y verano

Los datos cuantitativos correspondientes a la duración del efecto en cada fase en invierno y verano fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de los mínimos cuadrados usando un modelo general lineal. El nivel de significación fue de $p \leq 0,05$.

Con el fin de simplificar la interpretación de las tablas, y no manifestar redundancias innecesarias, se han eliminado de las mismas aquellos horarios en los cuales se repiten las comparaciones entre ellos.

En las siguientes tablas se reflejan la presencia o ausencia de significación estadística de cada parámetro estudiado. En los casos en que el valor de p fue superior a 0.05 se indica con N, mientras que si el valor de p fue inferior a 0.05 se refleja el valor numérico de dicha significación. Para el estudio estadístico detallado y completo en gatas véase el anexo II.

V.1.2.3.1.- Tiempo de inducción

Tabla V.11. Análisis estadístico del tiempo de inducción en las gatas, entre los diferentes horarios de invierno.

Inducción	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	N		
14:00 h	N	N	
20:00 h	N	N	N

Tabla V.12: Análisis estadístico del tiempo de inducción en las gatas, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Inducción	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				N

V.1.2.3.2.- Tiempo de inmovilización

Tabla V.13. Análisis estadístico del tiempo de inmovilización en las gatas, entre los diferentes horarios de invierno.

Inmovilización	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	N		
14:00 h	N	N	
20:00 h	N	N	p= 0,028

Tabla V.14: Análisis estadístico del tiempo de inmovilización en las gatas, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Inmovilización	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				p= 0,0001

V.1.2.3.3.- Tiempo de recuperación

Tabla V.15. Análisis estadístico del tiempo de recuperación en las gatas, entre los diferentes horarios de invierno

Recuperación	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	N		
14:00 h	N	N	
20:00 h	N	N	N

Tabla V.16: Análisis estadístico del tiempo de recuperación en las gatas, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas

Recuperación	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				p= 0,0107

V.1.2.3.4.- Tiempo de respuesta total

Tabla V.17. Análisis estadístico del tiempo de respuesta total en las gatas, entre los diferentes horarios de invierno.

Respuesta Total	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	N		
14:00 h	N	N	
20:00 h	N	p= 0,0113	N

Tabla V.18: Análisis estadístico del tiempo de respuesta total en las gatas, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Respuesta Total	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				p= 0,0024

V.1.3.- Resultados de los parámetros hemodinámicos en gatas

V.1.3.1.- Horarios de invierno

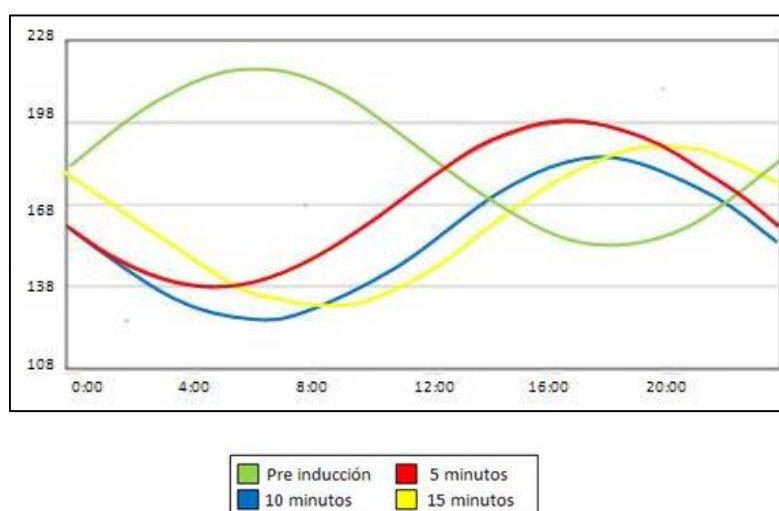
V.1.3.1.1.- Frecuencia cardíaca

En la tabla V.19 se reflejan los valores de frecuencia cardíaca previos a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato y los valores registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.9, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Con el fin de comparar las posibles diferencias en el comportamiento circadiano de cada parámetro estudiado, se han superpuesto las líneas circadianas de cada tiempo. Cada una coincide con su correspondiente valor de MESOR, por lo que en algunos gráficos la línea principal, sólo coincide con uno de los valores de MESOR.

Tabla V.19: Resultados obtenidos con respecto a la frecuencia cardíaca, expresados en latidos por minuto, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Gata	Horario de administración															
	02:00 h				08:00 h				14:00 h				20:00 h			
	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min
	Latidos por minuto															
g1	170	147	138	125	178	163	148	141	160	148	142	125	180	183	174	169
g2	200	180	185	178	200	173	157	146	200	178	174	166	150	146	140	126
g3	210	160	156	159	220	166	160	154	200	170	153	150	200	166	147	145
g4	180	157	135	125	180	166	140	135	160	167	157	151	170	176	160	151
g5	190	140	130	133	180	147	142	132	180	155	150	141	200	157	144	152
g6	183	144	110	106	180	147	134	130	150	146	130	129	166	150	146	136
g7	220	189	183	180	200	190	195	189	250	195	150	145	220	189	168	173
g8	180	195	185	183	220	191	181	180	200	185	181	175	200	211	214	230



MESOR: 190.2

Acrofase: 96° (6:24)

MESOR: 168

Acrofase: 255° (17:00)

MESOR: 156.7

Acrofase: -81° (18:33)

MESOR: 152

Acrofase: -53° (20:26)

Gráfico V.9. Análisis del comportamiento circadiano de la frecuencia cardíaca, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.3.1.2.-Presión arterial diastólica

En la tabla V.20 se reflejan los valores de presión arterial diastólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.10, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.20: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial diastólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
g1	65	56	50	68	53	64	62	51	49	70	63	60
g2	64	64	60	41	99	61	48	64	59	63	63	51
g3	64	61	60	66	72	67	63	65	70	54	60	70
g4	78	73	72	64	63	63	63	61	64	63	54	53
g5	70	70	63	73	81	85	60	48	46	64	62	102
g6	111	69	76	64	64	64	65	69	71	84	77	76
g7	86	67	68	58	64	69	92	84	96	109	78	82
g8	73	65	65	45	77	75	68	76	70	76	83	90

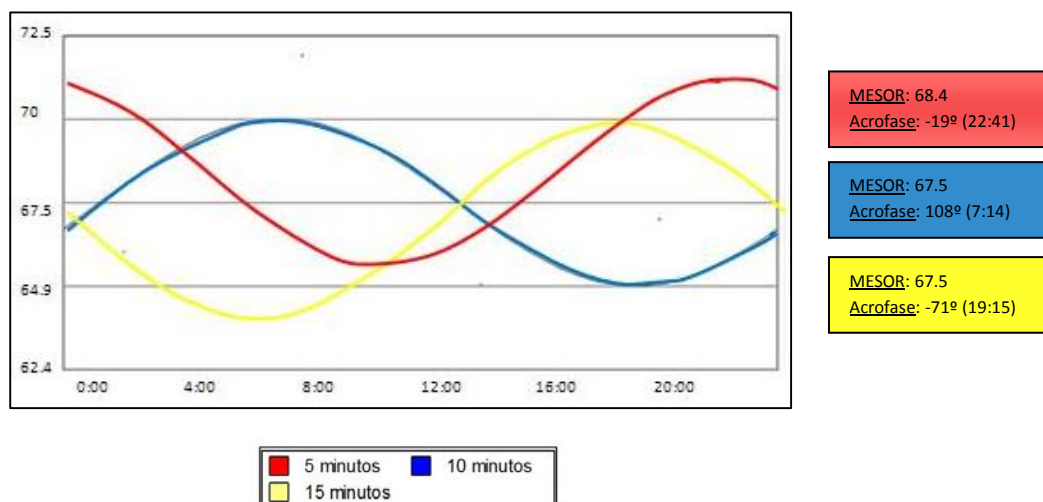


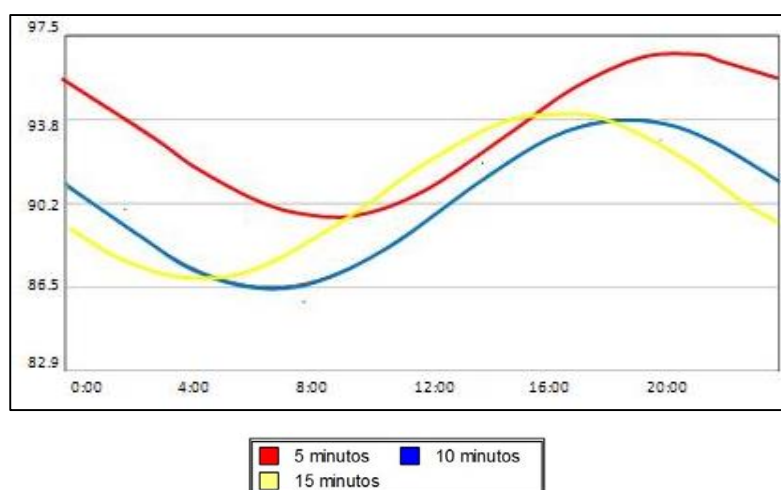
Gráfico V.10 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial diastólica, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.3.1.3.-Presión arterial media

En la tabla V.21 se reflejan los valores de presión arterial media registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.11, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.21: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial media, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
g1	90	76	73	68	53	64	84	80	71	96	92	91
g2	90	90	83	125	88	75	84	99	84	82	80	76
g3	92	92	84	92	93	85	97	99	94	83	87	88
g4	106	94	102	85	88	83	88	92	97	83	80	81
g5	97	93	90	93	97	111	80	62	98	94	99	112
g6	79	99	96	99	91	88	92	90	97	113	100	95
g7	106	91	87	85	85	88	120	116	134	129	102	102
g8	96	89	84	58	97	97	92	97	95	113	103	97



MESOR: 93.2
Acrofase: -49° (20:42)

MESOR: 90.2
Acrofase: -75° (18:57)

MESOR: 90.5
Acrofase: 247° (16:31)

Gráfico V.11 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial media, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.3.1.4.-Presión arterial sistólica

En la tabla V.22 se reflejan los valores de presión arterial sistólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.12, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.22: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial sistólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
g1	137	126	126	122	106	117	120	118	109	123	123	119
g2	120	120	117	167	126	119	122	140	129	135	126	118
g3	120	120	119	118	122	114	130	132	140	118	118	117
g4	136	138	138	112	112	107	119	115	114	117	111	114
g5	124	123	124	122	123	137	140	147	143	131	123	128
g6	147	135	132	138	136	144	136	123	114	141	139	137
g7	144	130	129	123	116	122	147	143	153	150	138	142
g8	132	131	121	122	121	119	121	120	125	140	138	135

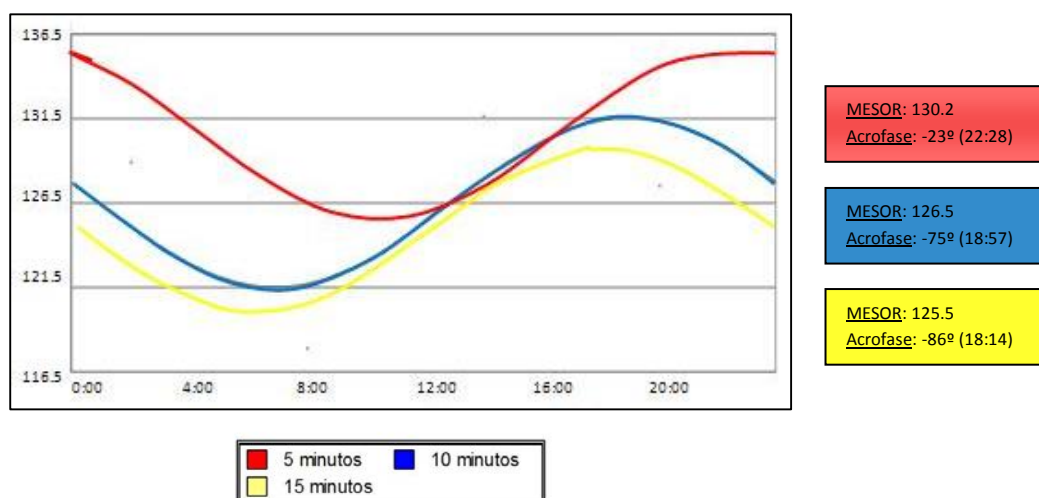


Gráfico V.12 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial sistólica, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.3.1.5.-Saturación de oxígeno arterial

En la tabla V.23 se reflejan los valores de saturación de oxígeno arterial registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.13, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.23: Resultados obtenidos con respecto a la saturación de oxígeno arterial, expresados en porcentaje (%), de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	Porcentaje (%)											
g1	98	99	97	98	98	98	98	97	96	94	96	97
g2	98	98	98	95	98	99	99	98	98	97	98	97
g3	99	98	99	97	99	98	96	98	99	98	96	95
g4	99	99	99	99	98	98	99	99	97	99	99	98
g5	98	95	96	96	98	98	98	97	98	96	93	93
g6	98	99	97	96	96	98	98	98	97	97	93	95
g7	99	98	99	95	95	96	95	96	97	96	97	97
g8	95	95	95	98	97	97	97	96	97	99	99	97

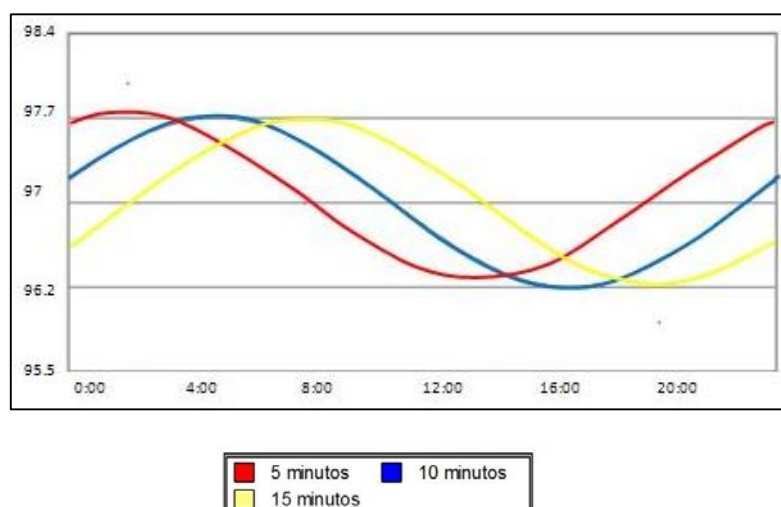


Gráfico V.13 Análisis del comportamiento circadiano de la saturación de oxígeno arterial, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de invierno.

V.1.3.2.- Horarios de verano

V.1.3.2.1.- Frecuencia cardíaca

En la tabla V.24 se reflejan los valores de frecuencia cardíaca previos a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato y los valores registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.14, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.24: Resultados obtenidos con respecto a la frecuencia cardíaca, expresados en latidos por minuto, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Gata	Horario de administración															
	02:00 h				08:00 h				14:00 h				20:00 h			
	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min
	Latidos por minuto															
g1	160	132	126	117	170	129	124	116	180	137	132	130	200	131	124	123
g2	200	201	198	195	180	187	193	171	190	210	209	206	160	205	199	188
g3	200	180	167	161	200	175	168	152	200	164	142	136	180	173	153	151
g4	180	160	140	137	180	206	189	182	180	154	149	153	200	160	147	140
g5	160	192	174	174	160	181	175	164	180	188	181	169	160	193	185	173
g6	160	146	145	138	160	150	145	136	160	165	155	145	180	148	150	150
g7	200	145	137	124	200	144	141	144	220	176	170	166	200	152	151	150
g8	220	169	173	168	220	168	160	160	210	155	153	144	230	168	156	158

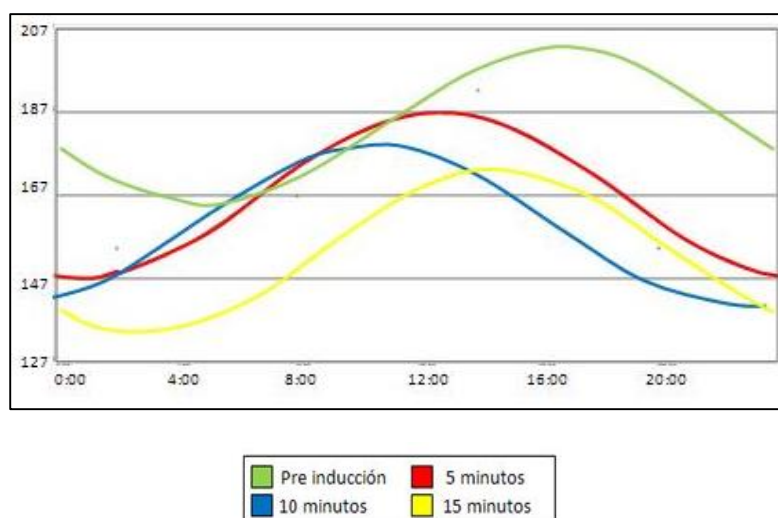


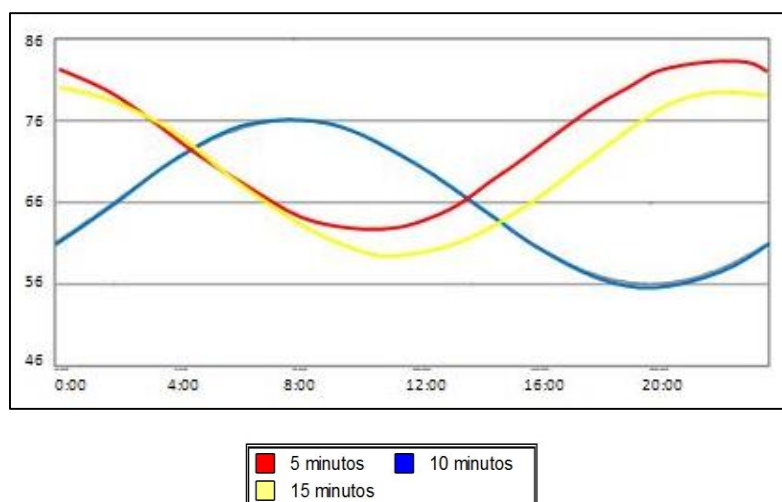
Gráfico V.14 Análisis del comportamiento circadiano de la frecuencia cardíaca, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.3.2.2.-Presión arterial diastólica

En la tabla V.25 se reflejan los valores de presión arterial diastólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.15, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.25: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial diastólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
g1	64	41	33	103	98	62	96	81	71	88	62	59
g2	89	64	110	86	52	53	99	85	87	75	69	121
g3	63	63	72	67	68	71	66	62	54	50	49	44
g4	69	44	52	57	61	105	42	47	46	81	88	90
g5	72	72	90	43	55	69	59	62	58	64	63	64
g6	64	69	65	75	78	61	69	60	49	81	81	93
g7	94	101	92	54	53	46	77	67	60	87	60	52
g8	82	69	80	75	77	67	65	56	55	65	58	85



MESOR: 72.7
Acrofase: -33° (21:47)

MESOR: 66
Acrofase: 120° (8:00)

MESOR: 69.2
Acrofase: 2° (23:50)

Gráfico V.15. Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial diastólica, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.3.2.3.-Presión arterial media

En la tabla V.26 se reflejan los valores de presión arterial media registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.16, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.26: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial media, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los diferentes horarios de administración en verano.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
g1	93	61	52	123	95	86	139	127	120	112	91	86
g2	125	97	134	109	72	76	138	119	118	102	99	126
g3	82	82	91	85	86	90	87	93	75	68	62	66
g4	85	64	73	78	86	125	63	65	72	109	111	116
g5	100	85	107	62	76	96	80	85	72	84	86	85
g6	86	93	89	93	96	78	91	79	70	111	112	121
g7	123	95	114	85	79	84	97	91	80	109	80	80
g8	119	106	116	107	102	95	91	82	82	95	93	121

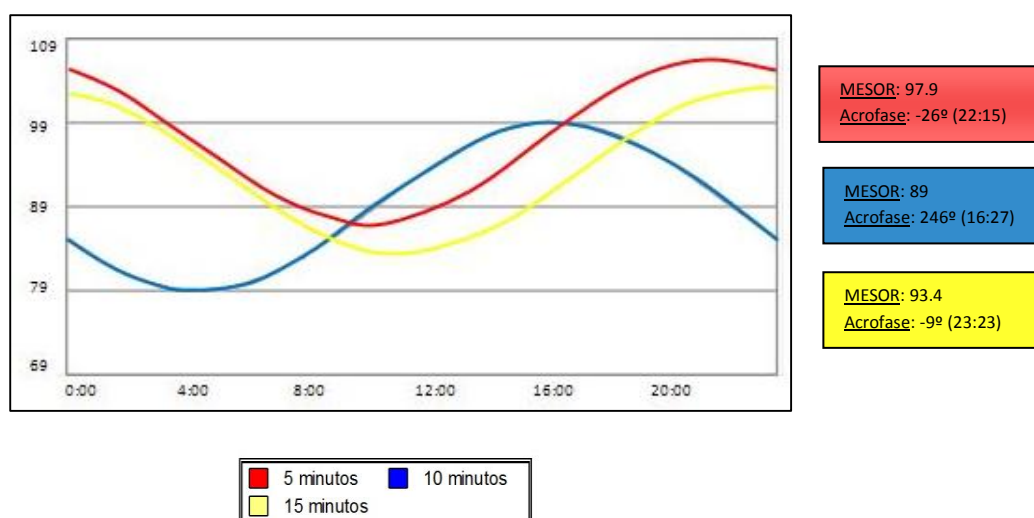


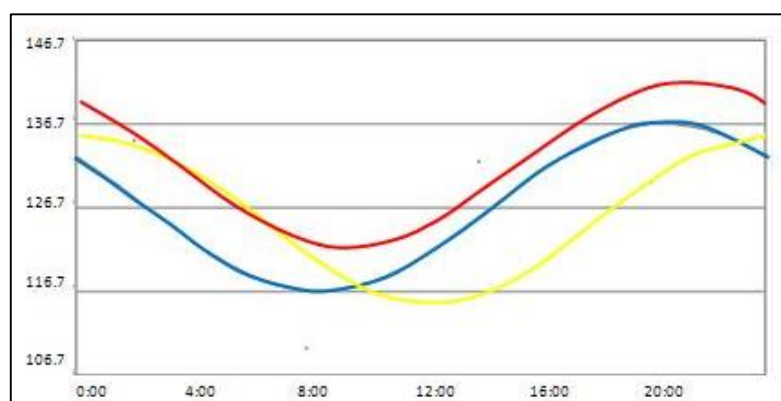
Gráfico V.16 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial media, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.3.2.4.-Presión arterial sistólica

En la tabla V.27 se reflejan los valores de presión arterial sistólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.17, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.27: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial sistólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
g1	125	99	87	145	123	110	168	160	146	144	122	118
g2	178	150	168	141	109	106	173	159	147	158	141	142
g3	107	120	127	105	115	124	119	120	110	101	106	99
g4	123	104	117	106	111	155	98	107	110	139	140	141
g5	139	145	160	104	119	128	129	126	125	128	128	132
g6	116	130	116	126	143	124	129	123	119	141	139	141
g7	165	149	138	124	104	116	124	118	109	139	117	109
g8	145	143	144	143	137	133	116	116	112	128	129	146



MESOR: 132
Acrofase: -35° (21:38)

MESOR: 126.7
Acrofase: -52° (20:29)

MESOR: 126.4
Acrofase: 8° (00:32)

5 minutos 10 minutos
15 minutos

Gráfico V.17 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial sistólica, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.3.2.5.-Saturación de oxígeno arterial

En la tabla V.28 se reflejan los valores de saturación de oxígeno arterial registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.18, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.28: Resultados obtenidos con respecto a la saturación de oxígeno arterial, expresados en porcentaje (%), de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Gata	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	Porcentaje (%)											
g1	93	92	92	96	97	94	94	96	98	96	95	95
g2	94	92	94	95	95	96	98	98	99	98	97	98
g3	85	87	92	95	96	98	94	98	97	94	95	98
g4	92	91	90	96	98	98	96	98	97	97	97	98
g5	96	98	98	97	97	98	97	98	98	94	98	97
g6	98	95	95	99	98	95	94	94	98	94	94	98
g7	97	95	96	99	98	96	97	99	99	95	97	97
g8	94	94	95	96	95	94	97	98	98	97	97	95

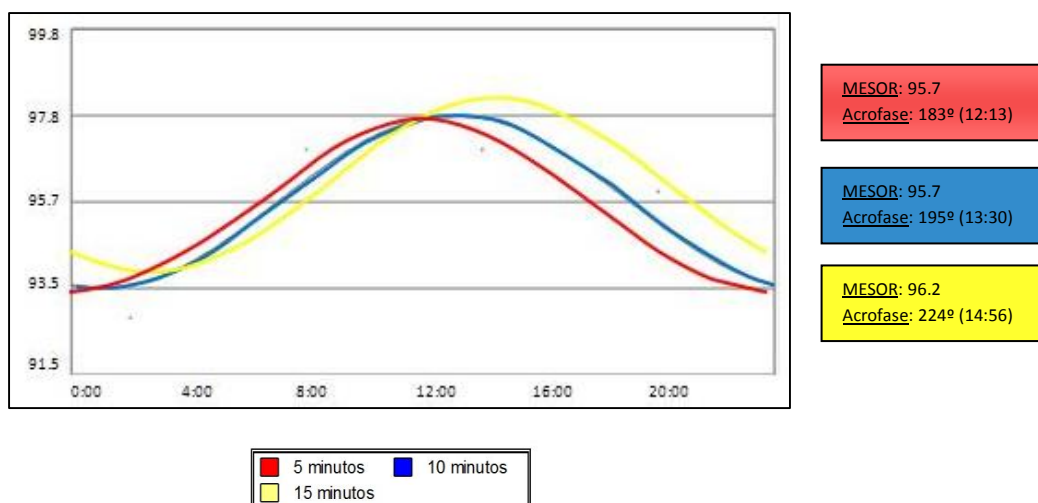


Gráfico V.18 Análisis del comportamiento circadiano de la saturación de oxígeno arterial, correspondiente a las gatas evaluadas durante los horarios de verano.

V.1.3.3.- Análisis estadísticos de los parámetros hemodinámicos en gatas entre los horarios de invierno y verano

Los datos cuantitativos correspondientes a la variación en los valores de los parámetros hemodinámicos en invierno y verano fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de los mínimos cuadrados usando un modelo general lineal. El nivel de significación fue de $p \leq 0,05$.

Con el fin de simplificar la interpretación de las tablas, y no manifestar redundancias innecesarias, se han eliminado de las mismas aquellos horarios en los cuales se repiten las comparaciones entre ellos.

En las siguientes tablas se reflejan la presencia o ausencia de significación estadística de cada parámetro estudiado. En los casos en que el valor de p fue superior a 0.05 se indica con N, mientras que si el valor de p fue inferior a 0.05 se refleja el valor numérico de dicha significación. Para el estudio estadístico detallado y completo en gatas véase el anexo II.

V.1.3.3.1.- Frecuencia cardíaca

Tabla V.29. Análisis estadístico de la variación en la frecuencia cardíaca antes de la inducción anestésica y a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de invierno

Frecuencia Cardíaca		02:00 h				08:00 h				14:00 h			
		Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min
08:00 h	Pre	N											
	5 min		N										
	10 min			N									
	15 min				N								
14:00 h	Pre	N				N							
	5 min		N				N						
	10 min			N				N					
	15 min				N				N				
20:00 h	Pre	N				N				N			
	5 min		N				N				N		
	10 min			N				N				N	
	15 min				N				N				N

Tabla V.30. Análisis estadístico de la variación en la frecuencia cardíaca antes de la inducción anestésica y a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas

Frecuencia Cardíaca		02:00 h				08:00 h				14:00 h				Verano
		Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	Pre	N												
	5 min		N											
	10 min			N										
	15 min				N									
14:00 h	Pre	N				N								
	5 min		N				N							
	10 min			N				N						
	15 min				N				N					
20:00 h	Pre	N				N				N				
	5 min		N				N				N			
	10 min			N				N				N		
	15 min				N				N				N	
Invierno														

V.1.3.3.2.- Presión arterial diastólica

Tabla V.31. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial diastólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de invierno.

Presión Arterial Diastólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	p= 0,0403								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			N		
	10 min		N			N			N	
	15 min			N			N			N

Tabla V.32. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial diastólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Presión Arterial Diastólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

V.1.3.3.3.- Presión arterial media

Tabla V.33. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial media a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de invierno.

Presión Arterial Media		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			N		
	10 min		N			N			N	
	15 min			N			N			N

Tabla V.34. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial media a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Presión Arterial Media		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

V.1.3.3.4.- Presión arterial sistólica

Tabla V.35. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial sistólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de invierno.

Presión Arterial Sistólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			N		
	10 min		N			N			N	
	15 min			N			N			N

Tabla V.36. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial sistólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Presión Arterial Sistólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

V.1.3.3.5.- Saturación de oxígeno arterial

Tabla V.37. Análisis estadístico de la variación en la saturación de oxígeno arterial a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de invierno.

Oximetría		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			N		
	10 min		N			N			N	
	15 min			N			N			N

Tabla V.38. Análisis estadístico de la variación en la saturación de oxígeno arterial a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las gatas, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Oximetría		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		p= 0,0008			N					
	15 min			p= 0,0007			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			p= 0,0007			N			N	
Invierno											

V.2.- Perras

V.2.1.- Examen clínico y analítica sanguínea de las perras

El examen clínico, los análisis hematológicos (Tabla V.39) y de la bioquímica sanguínea (Tabla V.40) realizados a las perras con antelación al comienzo del estudio, pusieron de manifiesto el correcto estado de salud de los animales (véase Anexo I). Durante el tiempo en que transcurrió el estudio no se observaron signos clínicos de alteración de dicho estado. Tampoco se observó inflamación o manifestaciones de dolor tras la administración de los fármacos a estudiar, por vía endovenosa.

Tabla V.39: Hematología previa al comienzo del estudio en las perras y sus correspondientes valores de referencia

Perras											
Animal	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Eritrocitos (millones/mm ³)	Leucocitos (miles/mm ³)	Neutrófilos en banda (%)	Neutrófilos segmentados (%)	Eosinófilos (%)	Linfocitos (%)	Basófilos (%)	Monocitos (%)	Plaquetas (miles/mm ³)
p1	35	12,4	6,3	6,4	0	65	1	32	0	2	210
p2	39	13,1	6,4	7,9	0	70	1	23	0	6	250
p3	32	12,5	5,3	9,8	0	74	1	23	0	2	180
p4	36	13,5	5,8	8,6	0	68	2	27	0	3	230
p5	35	12,8	6,2	10,5	0	63	1	34	0	2	300
p6	38	12,6	5,5	9,8	0	62	0	33	0	5	420
p7	40	14,1	6,8	11,3	0	64	2	30	0	4	180
p8	38	13,6	5,7	8,3	0	74	1	23	0	2	230
Referencias*	37 a 55	12 a 18,0	5,5 a 8,5	6 a 17	0 a 3	60 a 77	2 a 10	12 a 30	0 a 1	3 a 10	200 a 500

*Benjamín MM, 1984; Willard MD, 1993; Meyer DJ - Harvey JW, 1999

Tabla V.40 Bioquímica sanguínea previa al comienzo del estudio en las perras y sus correspondientes valores de referencia

Perras						
Animal	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)	FAS (UI/L)	Proteínas Totales (g/dl)
p1	0,65	23	21	26	125	6,2
p2	0,82	36	22	26	230	5,9
p3	0,56	25	26	30	178	6,4
p4	0,62	28	30	35	198	5,8
p5	0,95	36	25	32	164	6,1
p6	0,68	31	22	40	210	5,6
p7	0,54	38	29	42	174	7,1
p8	0,74	34	18	26	230	5,8
Referencias*	Hasta 1,5	15 a 50	Hasta 60	Hasta 80	Hasta 250	5,7 a 7,5

*Benjamín MM, 1984; Willard MD, 1993; Meyer DJ - Harvey JW, 1999

V.2.2.- Resultados de los parámetros anestésicos en perras

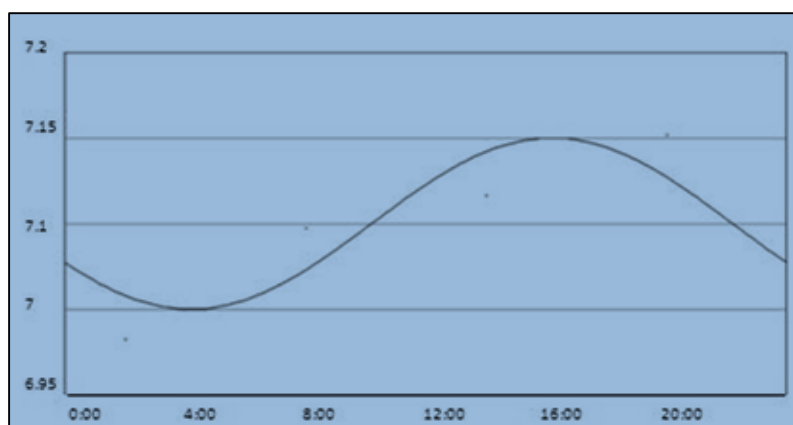
V.2.2.1.- Horarios de invierno

V.2.2.1.1.- Tiempo de inducción

En la tabla V.41 se reflejan los tiempos transcurridos desde la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato hasta la pérdida del reflejo de retirada podal, determinando la duración del tiempo de inducción anestésica, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.19, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.41: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inducción, expresados en segundos, de los diferentes animales en los distintos entes horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Segundos			
p1	7,8	7	7,7	7,1
p2	6,6	7,9	7,3	6,8
p3	s/d	7,3	7,4	7,4
p4	6,5	6,4	7,2	7,2
p5	7,2	7	7,6	7,5
p6	6,7	6,8	6	s/d
p7	7,7	7,2	6,6	7,3
p8	6,3	7,1	7,2	7



MESOR: 7.1
Acrofase: -242º (16:11)

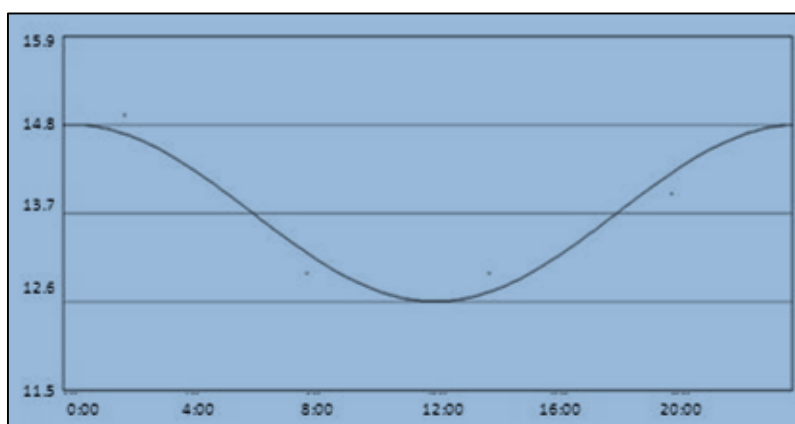
Gráfico V.19 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inducción, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.2.1.2.- Tiempo de inmovilización

En la tabla V.42 se reflejan los tiempos en que permanecieron inmóviles las perras (determinado desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de retirada podal en los 4 miembros), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.20, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.42: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inmovilización, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Minutos			
p1	9	10	10	9
p2	16	12	16	13
p3	s/d	14	11	12
p4	14	16	12	11
p5	22	15	17	19
p6	14	9	11	s/d
p7	14	12	15	15
p8	14	19	15	18



MESOR: 13.7
Acrofase: 3º (00:13)

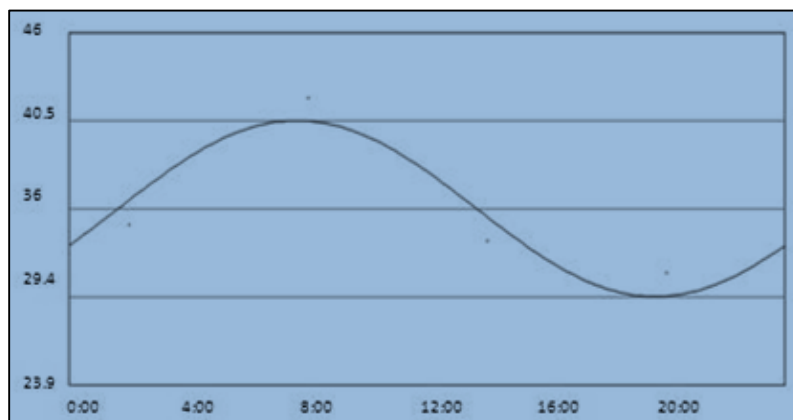
Gráfico V.20 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inmovilización, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.2.1.3.- Tiempo de recuperación

En la tabla V.43 se reflejan los tiempos que requirieron las perras para recuperarse (determinado desde la recuperación de reflejo de retirada podal en los 4 miembros, hasta recuperar una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.21, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.43: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de recuperación, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Minutos			
p1	27	38	33	30
p2	31	33	24	27
p3	s/d	35	34	26
p4	30	40	28	24
p5	45	47	34	42
p6	26	46	36	s/d
p7	41	59	40	32
p8	37	38	32	34



MESOR: 35
Acrofase: 114º (7:39)

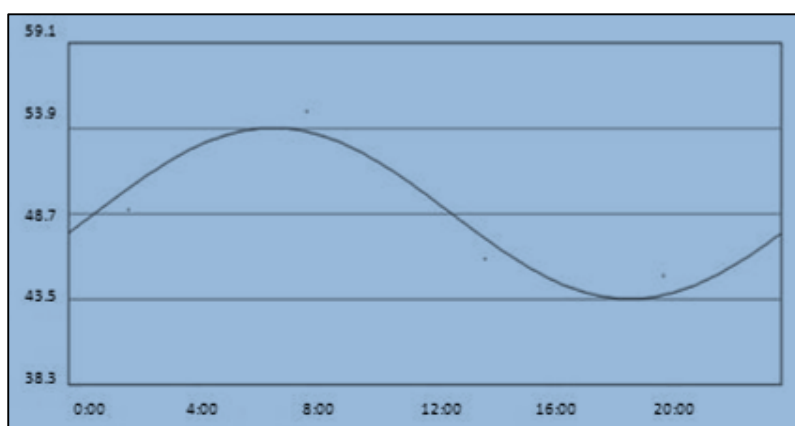
Gráfico V.21 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de recuperación, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.2.1.4.- Tiempo de respuesta total

En la tabla V.44 se reflejan los tiempos de respuesta total de las perras (determinado desde la administración de los fármacos hasta la recuperación de una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.22, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.44: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de respuesta total, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Minutos			
p1	36	48	43	39
p2	47	45	40	40
p3	s/d	49	45	38
p4	44	56	40	35
p5	67	62	51	61
p6	40	55	47	s/d
p7	55	71	55	47
p8	51	57	47	52



MESOR: 48.7
Acrofase: 103° (6:53)

Gráfico V.22 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de respuesta total, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

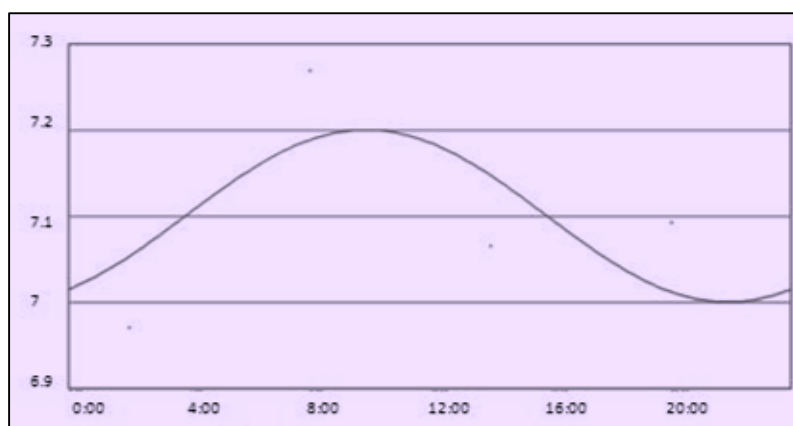
V.2.2.2.- Horarios de verano

V.2.2.2.1.- Tiempo de inducción

En la tabla V.45 se muestran los tiempos transcurridos desde la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato hasta la pérdida del reflejo de retirada podal, determinando la duración del tiempo de inducción anestésica, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.23, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.45: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inducción, expresados en segundos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Segundos			
p1	7,8	7	7,5	7,3
p2	6,5	7,9	7,3	6,7
p3	7,2	7,7	7,9	7,5
p4	6,7	6,8	7,3	7,2
p5	7,1	7,5	8	8,1
p6	6,8	7	6,1	6,8
p7	7,7	7,2	6,6	7,4
p8	6,4	7,3	6,2	6,1



MESOR: 7.1
Acrofase: 148° (9:53)

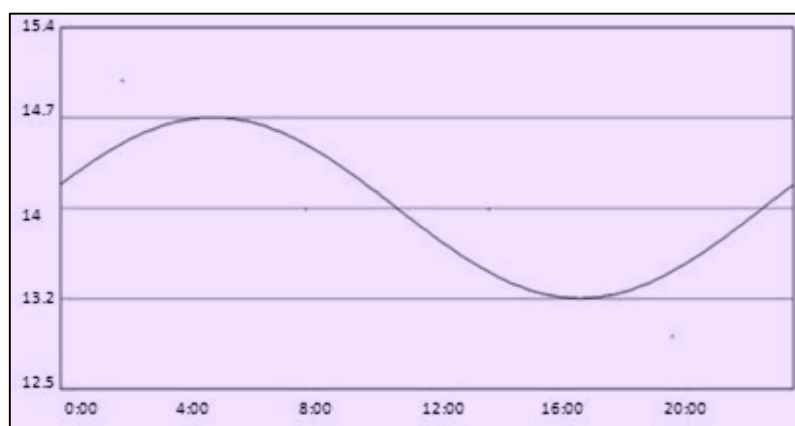
Gráfico V.23 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inducción, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.2.2.2.- Tiempo de inmovilización

En la tabla V.46 se reflejan los tiempos de inmovilización de las perras (determinado desde la pérdida hasta la recuperación del reflejo de retirada podal en los 4 miembros), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.24, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.46: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de inmovilización, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Minutos			
p1	10	9	11	7
p2	13	15	15	10
p3	11	12	12	11
p4	18	18	20	21
p5	17	17	16	16
p6	16	17	15	12
p7	22	18	10	17
p8	15	16	12	14



MESOR: 14
Acrofase: 75º (5:00)

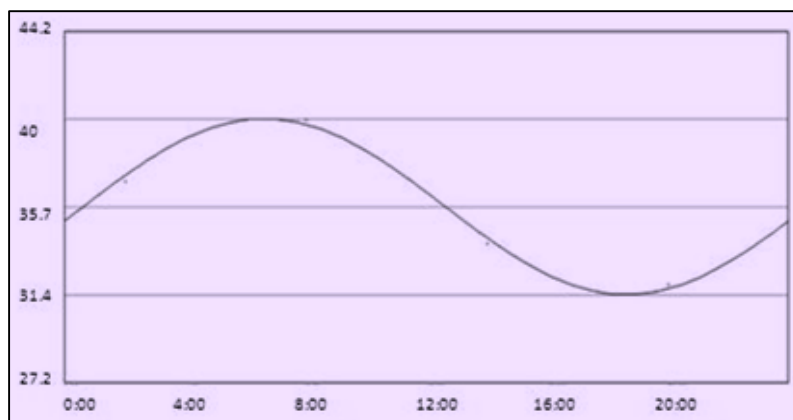
Gráfico V.24 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de inmovilización, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.2.2.3.- Tiempo de recuperación

En la tabla V.47 se reflejan los tiempos que requirieron las perras para recuperarse (determinado desde la recuperación de reflejo de retirada podal en los 4 miembros, hasta recuperar una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.25, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.47: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de recuperación, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Minutos			
p1	30	28	32	26
p2	37	31	21	35
p3	30	17	27	16
p4	38	61	37	45
p5	45	48	37	33
p6	34	35	32	25
p7	49	54	47	39
p8	31	44	37	36



MESOR: 35.7
Acrofase: 99º (6:37)

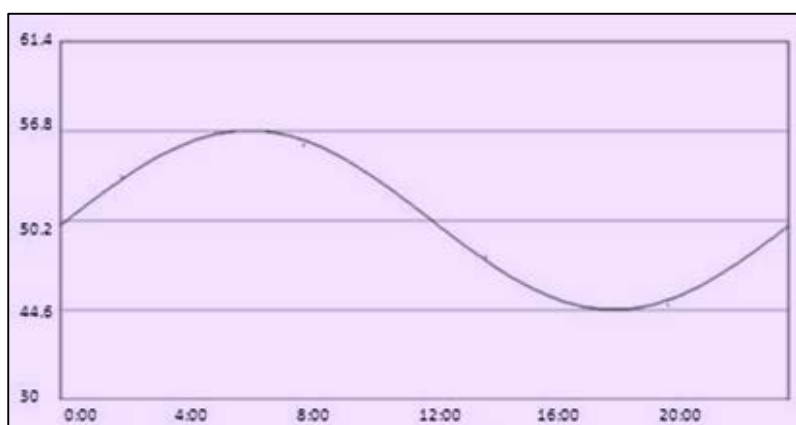
Gráfico V.25 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de recuperación, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.2.2.4.- Tiempo de respuesta total

En la tabla V.48 se reflejan los tiempos de respuesta total de las gatas (determinado desde la administración de los fármacos hasta la recuperación de una posición de pie controlado), tras la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.26, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.48: Resultados obtenidos con respecto a la duración del tiempo de respuesta total, expresados en minutos, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

	Horario de administración			
	02:00 h	08:00 h	14:00 h	20:00 h
Perra	Minutos			
p1	40	37	43	33
p2	51	46	36	45
p3	41	29	39	27
p4	56	79	57	66
p5	62	65	53	49
p6	50	52	47	37
p7	71	72	57	56
p8	46	60	49	50



MESOR: 50.2
Acrofase: 93º (6:13)

Gráfico V.26 Análisis del comportamiento circadiano del tiempo de respuesta total, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.2.3.- Análisis estadísticos de los parámetros anestésicos en perras entre los horarios de invierno y verano

Los datos cuantitativos correspondientes a la duración del efecto en cada fase en invierno y verano fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de los cuadrados mínimos usando un modelo general lineal. El nivel de significación fue de $p \leq 0,05$.

Con el fin de simplificar la interpretación de las tablas, y no manifestar redundancias innecesarias, se han eliminado de las mismas aquellos horarios en los cuales se repiten las comparaciones entre ellos.

En las siguientes tablas se reflejan la presencia o ausencia de significación estadística de cada parámetro estudiado. En los casos en que el valor de p fue superior a 0.05 se indica con N, mientras que si el valor de p fue inferior a 0.05 se refleja el valor numérico de dicha significación. Para el estudio estadístico detallado y completo en perras véase el anexo III.

V.2.2.3.1.- Tiempo de inducción

Tabla V.49. Análisis estadístico del tiempo de inducción en las perras, entre los diferentes horarios de invierno.

Inducción	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	N		
14:00 h	N	N	
20:00 h	N	N	N

Tabla V.50: Análisis estadístico del tiempo de inducción en las perras, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Inducción	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				N

V.2.2.3.2.- Tiempo de inmovilización

Tabla V.51. Análisis estadístico del tiempo de inmovilización en las perras, entre los diferentes horarios de invierno.

Inmovilización	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	N		
14:00 h	N	N	
20:00 h	N	N	N

Tabla V.52: Análisis estadístico del tiempo de inmovilización en las perras, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Inmovilización	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				N

V.2.2.3.3.- Tiempo de recuperación

Tabla V.53. Análisis estadístico del tiempo de recuperación en las perras, entre los diferentes horarios de invierno.

Recuperación	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	$p=0,0009$		
14:00 h	N	$p=0,0009$	
20:00 h	N	$p=0,0009$	N

Tabla V.54: Análisis estadístico del tiempo de recuperación en las perras, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Recuperación	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	N	N	
Invierno				N

V.2.2.3.4.- Tiempo de respuesta total

Tabla V.55. Análisis estadístico del tiempo de respuesta total en las perras, entre los diferentes horarios de invierno.

Respuesta Total	02:00 h	08:00 h	14:00 h
08:00 h	$p=0,002$		
14:00 h	N	$p=0,002$	
20:00 h	N	$p=0,002$	N

Tabla V.56: Análisis estadístico del tiempo de respuesta total en las perras, entre los diferentes horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Respuesta Total	02:00 h	08:00 h	14:00 h	Verano
08:00 h	N			
14:00 h	N	N		
20:00 h	N	$p=0,0269$	N	
Invierno				N

V.2.3.- Resultados de los parámetros hemodinámicos en perras

V.2.3.1.- Horarios de invierno

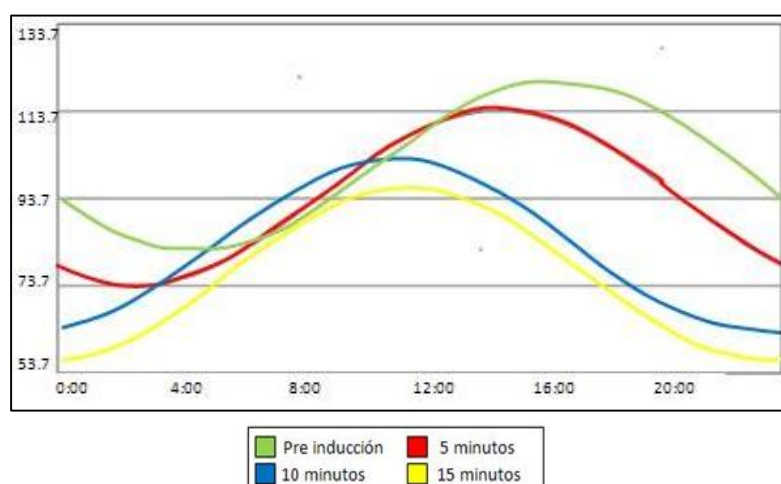
V.2.3.1.1.- Frecuencia cardíaca

En la tabla V.57 se reflejan los valores de frecuencia cardíaca previos a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato y los valores registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.27, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Con el fin de comparar las posibles diferencias en el comportamiento circadiano de cada parámetro estudiado, se han superpuesto las líneas circadianas de cada tiempo, cada una coincide con su correspondiente valor de MESOR, por lo que en algunos gráficos la línea principal, sólo coincide con uno de los valores de MESOR.

Tabla V.57: Resultados obtenidos con respecto a la frecuencia cardíaca, expresados en latidos por minuto, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h				08:00 h				14:00 h			
	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min	preinducción	5 min	10 min	15 min
Latidos por minuto												
p1	70	69	94	64	96	79	86	89	90	70	70	100
p2	92	72	52	73	96	97	93	100	100	80	70	70
p3	s/d	s/d	s/d	s/d	100	95	83	80	130	85	95	94
p4	120	97	75	72	140	120	109	84	140	129	109	95
p5	96	75	64	59	68	75	61	71	80	97	84	72
p6	115	105	86	85	96	128	107	109	120	90	72	86
p7	96	100	78	86	110	93	83	78	85	83	81	75
p8	108	87	79	60	112	98	86	86	120	100	96	102



MESOR: 104.7
Acrofase: 251° (16:56)

MESOR: 93.7
Acrofase: 219° (14:37)

MESOR: 81.7
Acrofase: 168° (11:12)

MESOR: 79.7
Acrofase: 170° (11:23)

Gráfico V.27 Análisis del comportamiento circadiano de la frecuencia cardíaca, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.3.1.2.-Presión arterial diastólica

En la tabla V.58 se reflejan los valores de presión arterial diastólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.28, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.58: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial diastólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	58	69	57	82	80	80	85	94	93	47	44	48
p2	49	48	50	69	61	71	67	64	68	50	46	69
p3	s/d	s/d	s/d	82	51	60	73	71	65	53	45	52
p4	55	55	49	46	41	48	78	49	57	30	34	50
p5	68	64	48	63	67	49	92	66	69	84	76	81
p6	44	57	49	49	41	48	55	62	42	s/d	s/d	s/d
p7	36	47	56	63	53	70	49	45	47	47	38	38
p8	58	48	45	45	40	37	52	46	41	41	45	54

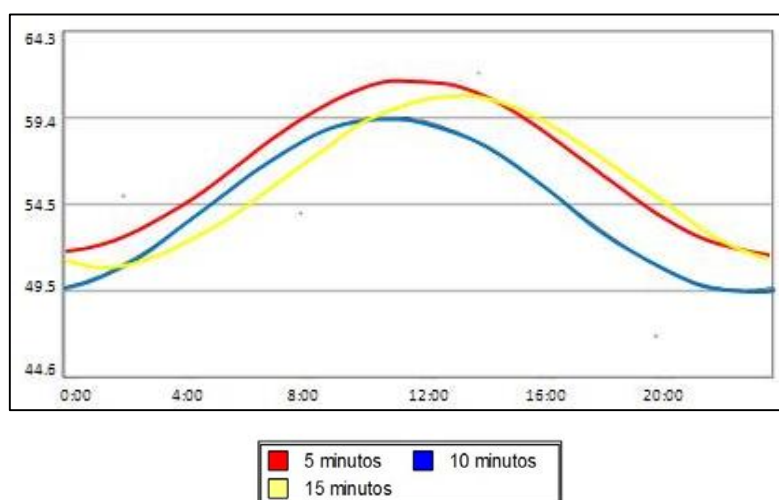


Gráfico V.28 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial diastólica, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.3.1.3.-Presión arterial media

En la tabla V.59 se reflejan los valores de presión arterial media registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.29, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.59: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial media, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	74	75	63	99	111	104	100	105	104	78	58	60
p2	67	62	70	83	79	91	79	78	84	64	69	83
p3	s/d	s/d	s/d	87	82	76	108	95	98	68	57	69
p4	72	71	62	79	61	65	94	62	68	47	47	55
p5	106	84	74	99	83	62	117	104	83	102	87	86
p6	61	68	66	82	64	74	70	84	53	s/d	s/d	s/d
p7	58	91	70	78	88	92	78	66	64	70	56	56
p8	73	60	52	61	52	59	67	61	59	62	56	64

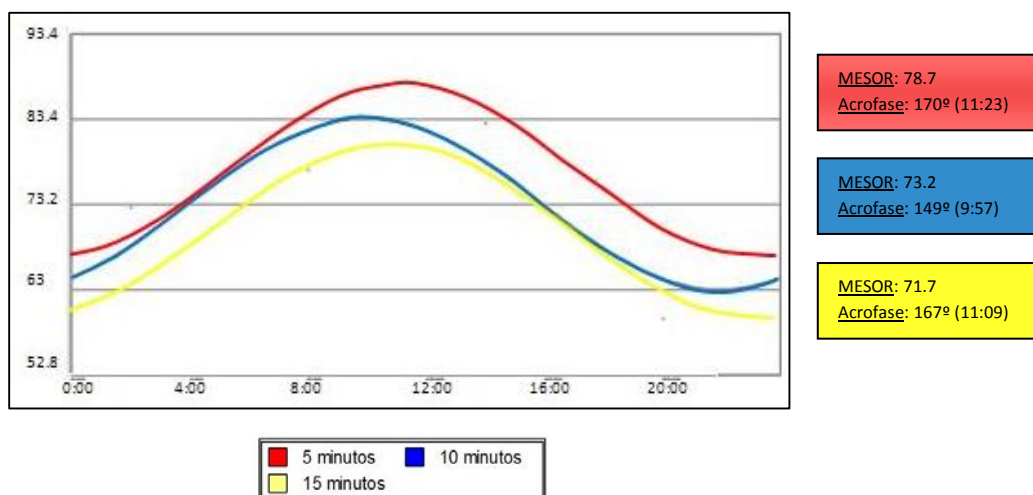


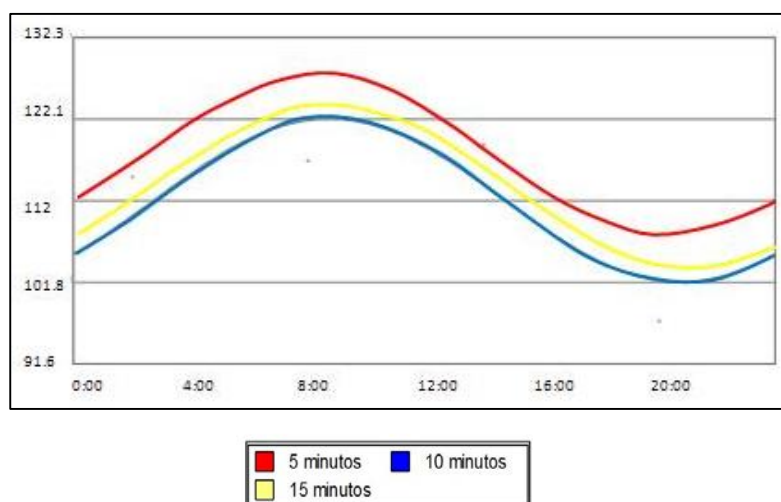
Gráfico V.29 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial media, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.3.1.4.-Presión arterial sistólica

En la tabla V.60 se reflejan los valores de presión arterial sistólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.30, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.60: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial sistólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	110	116	115	133	134	129	130	138	129	112	102	97
p2	114	106	108	107	105	122	117	108	109	134	120	131
p3	s/d	s/d	s/d	135	132	137	145	166	169	108	91	116
p4	108	116	113	114	106	104	134	92	89	75	72	70
p5	162	136	123	147	135	133	159	136	114	127	112	106
p6	129	105	104	124	107	109	94	104	123	s/d	s/d	s/d
p7	113	128	136	136	129	133	111	110	104	97	84	87
p8	121	101	100	93	91	93	102	100	98	94	96	91



MESOR: 119.2
 Acrofase: 126° (8:26)

MESOR: 112
 Acrofase: 131° (8:45)

MESOR: 112.7
 Acrofase: 128° (8:34)

Gráfico V.30 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial sistólica, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

V.2.3.1.5.-Saturación de oxígeno arterial

En la tabla V.61 se reflejan los valores de saturación de oxígeno arterial registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.31, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.61: Resultados obtenidos con respecto a la saturación de oxígeno arterial, expresados en porcentaje (%), de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en invierno.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	92	90	95	78	96	92	93	91	92	93	95	97
p2	88	86	88	95	92	95	83	87	92	82	83	93
p3	s/d	s/d	s/d	82	85	91	88	92	94	87	89	92
p4	86	87	88	92	85	94	93	92	93	83	86	92
p5	85	90	95	88	88	91	87	93	96	84	83	90
p6	83	86	92	91	88	90	80	87	94	s/d	s/d	s/d
p7	78	84	90	93	91	95	83	93	95	83	94	95
p8	82	83	93	91	86	94	75	87	89	85	90	85

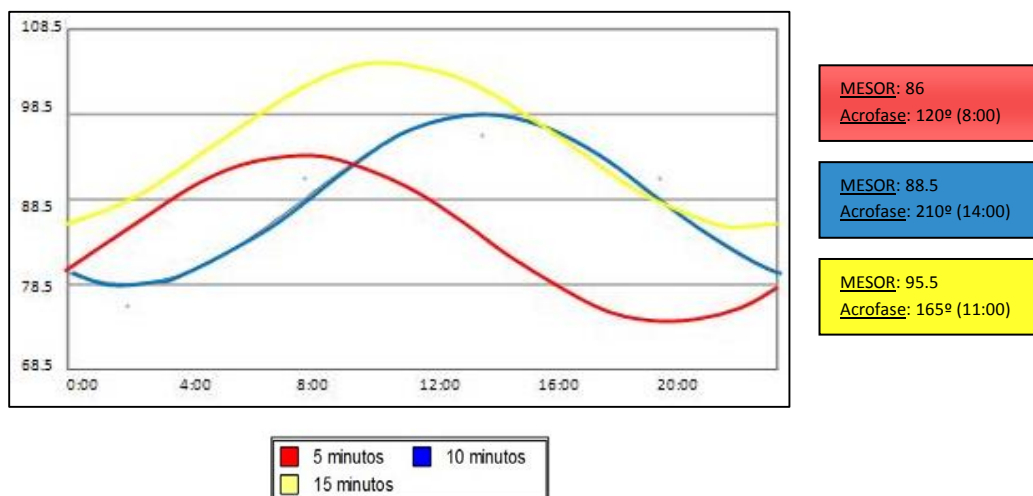


Gráfico V.31 Análisis del comportamiento circadiano de la saturación de oxígeno arterial, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de invierno.

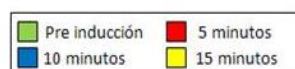
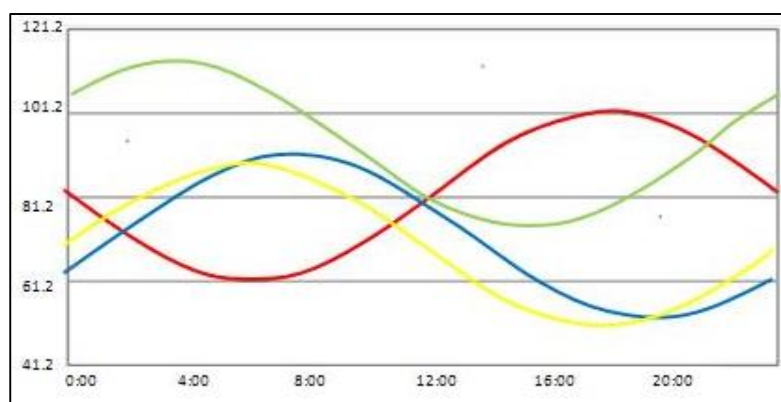
V.2.3.2.- Horarios de verano

V.2.3.2.1.- Frecuencia cardíaca

En la tabla V.62 se reflejan los valores de frecuencia cardíaca previos a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato y los valores registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de los fármacos, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.32, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.62: Resultados obtenidos con respecto a la frecuencia cardíaca, expresados en latidos por minuto, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Perra	Horario de administración															
	02:00 h				08:00 h				14:00 h				20:00 h			
	pre induccion	5 min	10 min	15 min	pre induccion	5 min	10 min	15 min	pre induccion	5 min	10 min	15 min	pre induccion	5 min	10 min	15 min
	Latidos por minuto															
p1	108	84	68	95	80	89	78	92	108	75	75	82	56	75	90	84
p2	84	121	93	101	110	98	85	107	92	102	60	55	114	108	100	60
p3	108	90	107	125	128	110	109	105	124	113	123	107	84	87	70	75
p4	90	76	65	59	92	62	55	50	84	58	54	53	68	60	54	56
p5	90	82	63	60	87	72	81	63	96	107	94	78	144	87	63	53
p6	108	80	74	56	100	87	70	60	104	75	60	54	124	91	82	63
p7	84	72	68	61	84	60	57	61	84	74	70	90	102	53	46	44
p8	136	55	57	52	128	54	58	55	80	64	55	53	104	91	77	86



MESOR: 99.2
Acrofase: 51° (3:27)

MESOR: 81.2
Acrofase: -86° (18:14)

MESOR: 73.7
Acrofase: 120° (8:00)

MESOR: 71.5
Acrofase: 90° (6:30)

Gráfico V.32 Análisis del comportamiento circadiano de la frecuencia cardíaca, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.3.2.2.-Presión arterial diastólica

En la tabla V.63 se reflejan los valores de presión arterial diastólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.33, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.63: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial diastólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	85	66	83	63	66	64	91	74	68	75	63	65
p2	36	50	37	54	40	45	48	51	51	51	52	49
p3	47	54	67	40	35	45	46	40	50	53	49	54
p4	71	47	42	51	51	40	73	48	36	55	46	36
p5	46	41	44	56	51	41	44	38	33	37	43	41
p6	63	53	68	52	51	52	72	66	66	40	43	49
p7	45	42	43	41	47	43	56	62	50	64	53	45
p8	58	51	84	55	50	59	61	61	82	44	72	78

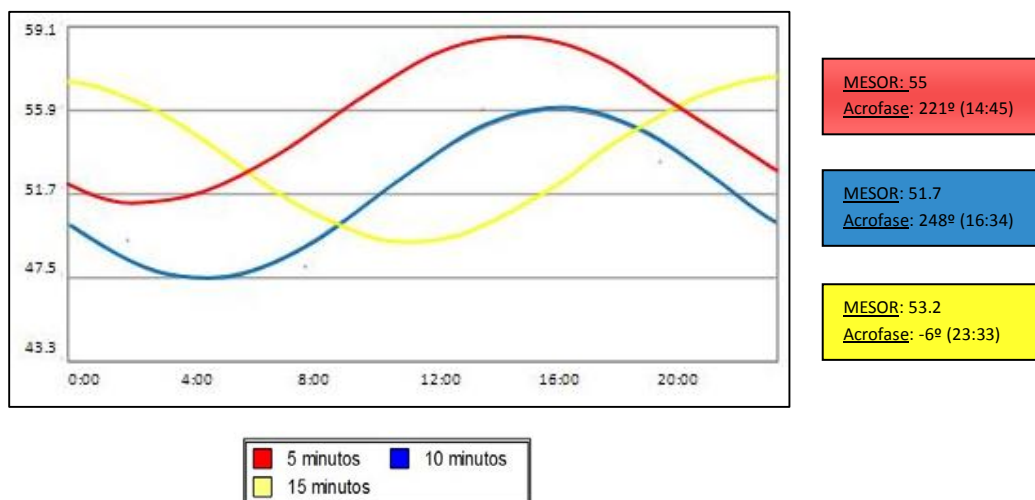


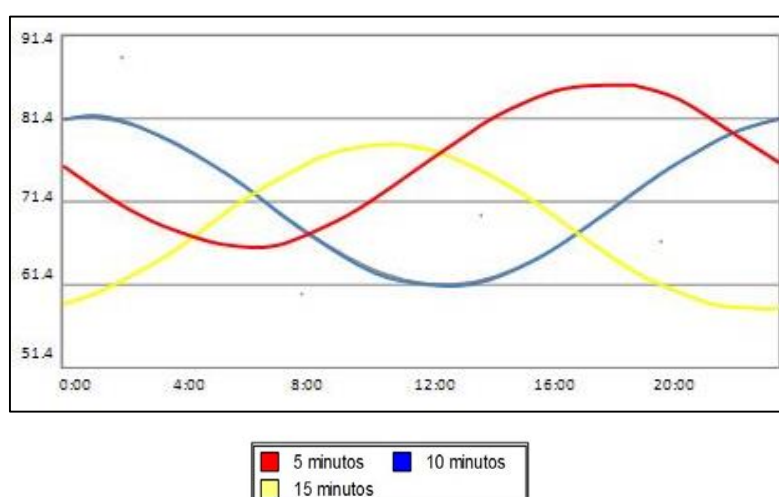
Gráfico V.33 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial diastólica, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.3.2.3.-Presión arterial media

En la tabla V.64 se reflejan los valores de presión arterial media registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.34, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.64: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial media, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	97	98	99	90	92	83	103	88	90	95	89	84
p2	49	72	47	77	66	94	67	59	67	66	58	59
p3	66	97	85	64	58	63	71	62	63	67	60	61
p4	88	69	55	61	68	56	92	79	51	74	70	67
p5	68	55	60	74	67	51	63	48	52	54	57	56
p6	100	83	76	66	60	65	82	76	82	75	66	62
p7	69	71	58	65	63	66	70	79	75	81	78	73
p8	76	72	92	78	67	81	78	78	102	80	82	84



MESOR: 75.2
Acrofase: -85° (18:14)

MESOR: 71.4
Acrofase: 11° (00:46)

MESOR: 70.5
Acrofase: 165° (11:00)

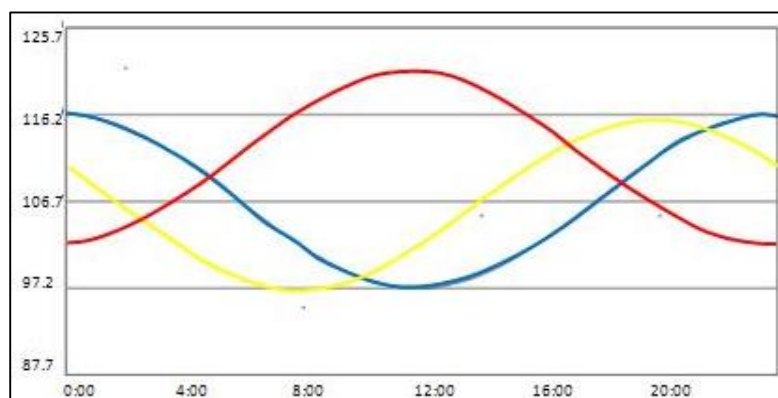
Gráfico V.34 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial media, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.3.2.4.-Presión arterial sistólica

En la tabla V.65 se reflejan los valores de presión arterial sistólica registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.35, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.65: Resultados obtenidos con respecto a la presión arterial sistólica, expresados en mmHg, de los diferentes animales en los distintos horarios de administración en verano.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	mmHg											
p1	135	135	129	144	111	123	142	132	122	136	129	115
p2	78	98	81	120	96	122	104	87	91	111	101	99
p3	111	130	117	96	94	103	97	95	94	104	84	115
p4	128	118	103	131	110	107	129	109	106	123	110	107
p5	98	86	92	102	99	80	111	80	84	93	93	98
p6	124	112	106	95	93	87	118	123	113	109	94	102
p7	119	118	96	105	98	106	111	111	104	120	114	107
p8	110	117	127	126	106	119	116	115	133	109	121	120



MESOR: 114.2
Acrofase: 176° (11:45)

MESOR: 106.7
Acrofase: -2° (23:52)

MESOR: 106.5
Acrofase: -59° (20:10)

Gráfico V.35 Análisis del comportamiento circadiano de la presión arterial sistólica, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.3.2.5.-Saturación de oxígeno arterial

En la tabla V.66 se reflejan los valores de saturación de oxígeno arterial registrados a los 5, 10 y 15 minutos posteriores a la administración de 0.1 mg/kg de midazolam y 3 mg/kg de etomidato, a los diferentes horarios seleccionados para el estudio cronobiológico, cuyo análisis circadiano se muestra en el gráfico V.36, así como los correspondientes valores de MESOR y Acrofase.

Tabla V.66: Resultados obtenidos con respecto a la saturación de oxígeno arterial, expresados en porcentaje (%), de los diferentes animales en los diferentes horarios de administración en verano.

Perra	Horario de administración											
	02:00 h			08:00 h			14:00 h			20:00 h		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
	Porcentaje (%)											
p1	85	90	92	87	95	94	85	88	95	90	93	96
p2	88	91	92	88	95	94	87	85	93	88	93	92
p3	87	93	96	81	88	89	89	90	88	86	92	93
p4	89	87	90	84	85	88	87	90	92	80	84	93
p5	83	84	87	90	92	93	85	88	86	88	88	92
p6	88	92	95	83	87	90	96	94	95	91	95	95
p7	92	93	93	80	94	95	95	93	92	80	95	95
p8	85	82	94	93	93	95	90	85	92	85	93	96

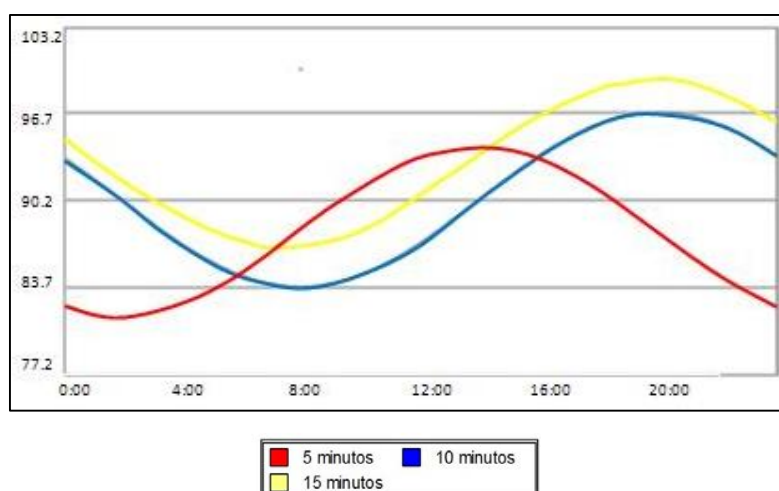


Gráfico V.36. Análisis del comportamiento circadiano de la saturación de oxígeno arterial, correspondiente a las perras evaluadas durante los horarios de verano.

V.2.3.3.- Análisis estadísticos de los parámetros hemodinámicos en perras entre los horarios de invierno y verano

Los datos cuantitativos correspondientes a la variación en los valores de los parámetros hemodinámicos en invierno y verano fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de los mínimos cuadrados usando un modelo general lineal. El nivel de significación fue de $p \leq 0,05$.

Con el fin de simplificar la interpretación de las tablas, y no manifestar redundancias innecesarias, se han eliminado de las mismas aquellos horarios en los cuales se repiten las comparaciones entre ellos.

En las siguientes tablas se reflejan la presencia o ausencia de significación estadística de cada parámetro estudiado. En los casos en que el valor de p fue superior a 0.05 se indica con N, mientras que si el valor de p fue inferior a 0.05 se refleja el valor numérico de dicha significación. Para el estudio estadístico detallado y completo en gatas véase el anexo II.

V.2.3.3.1.- Frecuencia cardíaca

Tabla V.67. Análisis estadístico de la variación en la frecuencia cardíaca antes de la inducción anestésica y a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de invierno.

Frecuencia Cardíaca	02:00 h				08:00 h				14:00 h			
	Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min
08:00 h	Pre	N										
	5 min		N									
	10 min			N								
	15 min				N							
14:00 h	Pre	N			N							
	5 min		N			N						
	10 min			N			N					
	15 min				N			N				
20:00 h	Pre	N			N				N			
	5 min		$p=0,0368$			N				N		
	10 min			N			N				N	
	15 min				N			N				N

Tabla V.68. Análisis estadístico de la variación en la frecuencia cardíaca antes de la inducción anestésica y a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Frecuencia Cardíaca	02:00 h				08:00 h				14:00 h				Verano		
	Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min	Pre	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	Pre	N													
	5 min		N												
	10 min			N											
	15 min				N										
14:00 h	Pre	N			N										
	5 min		N			N									
	10 min			N			N								
	15 min				N			N							
20:00 h	Pre	N			N				N						
	5 min		N			N				N					
	10 min			N			N				N				
	15 min				N			N				N			
Invierno	5 min												$p=0,0039$		
	10 min													$p=0,0282$	
	15 min														$p=0,0314$

V.2.3.3.2.- Presión arterial diastólica

Tabla V.69. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial diastólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de invierno.

Presión Arterial Diastólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			p= 0,015		
	10 min		N			N			p= 0,0492	
	15 min			N			N			N

Tabla V.70. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial diastólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Presión Arterial Diastólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			p= 0,0171							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

V.2.3.3.3.- Presión arterial media

Tabla V.71. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial media a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de invierno.

Presión Arterial Media		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	p= 0,0026			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			p= 0,0026			p= 0,0026		
	10 min		N			N			p= 0,0245	
	15 min			N			N			N

Tabla V.72. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial media a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estudiadas.

Presión Arterial Media		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

V.2.3.3.4.- Presión arterial sistólica

Tabla V.73. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial sistólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de invierno.

Presión Arterial Sistólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			N		
	10 min		p= 0,0259			p= 0,0259			p= 0,0259	
	15 min			p= 0,0262			p= 0,0262			p= 0,0262

Tabla V.74. Análisis estadístico de la variación en la presión arterial sistólica a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Presión Arterial Sistólica		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

V.2.3.3.5.- Saturación de oxígeno arterial

Tabla V.75. Análisis estadístico de la variación en la saturación de oxígeno arterial a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de invierno.

Oximetría		02:00 h			08:00 h			14:00 h		
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
08:00 h	5 min	N								
	10 min		N							
	15 min			N						
14:00 h	5 min	N			N					
	10 min		N			N				
	15 min			N			N			
20:00 h	5 min	N			N			N		
	10 min		N			N			N	
	15 min			N			N			N

Tabla V.76. Análisis estadístico de la variación en la saturación de oxígeno arterial a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos en las perras, entre los distintos horarios de verano y entre ambas estaciones estudiadas.

Oximetría		02:00 h			08:00 h			14:00 h			Verano
		5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min	
08:00 h	5 min	N									
	10 min		N								
	15 min			N							
14:00 h	5 min	N			N						
	10 min		N			N					
	15 min			N			N				
20:00 h	5 min	N			N			N			
	10 min		N			N			N		
	15 min			N			N			N	
Invierno											N

VI.- Discusión

VI.1- Discusión del material

VI.1.1.- Material biológico

Para nuestro estudio se utilizaron felinos hembras, mestizas, adultas, con un peso de 2,8 a 4,8 Kg y caninos hembras, mestizas, adultas, con un peso de 8 a 18 Kg, de manera que se pudieran crear con ellas dos grupos homogéneos (gatas y perras). Los animales fueron criados y alimentados con alimento balanceado específico para cada especie (Royal Canin® Size Health Nutrition).

También tuvimos en cuenta la edad, trabajando con animales considerados adultos en todos los aspectos, de forma que los sistemas de eliminación (metabolismo y excreción renal y hepática), fueran totalmente maduros.

Existen diferentes formas de evaluar la influencia circadiana sobre determinados parámetros en los animales. Se pueden realizar los estudios correspondientes ateniéndose a los horarios normales (acordes a lo que marca el reloj) y realizando las determinaciones en las horas establecidas (o programadas) que se corresponden con el día; o bien, modificando el ciclo circadiano de los animales mediante la utilización de cámaras cronobiológicas que permiten modificar las condiciones naturales de luz, temperatura y humedad del ambiente; y después de un periodo mayor de 15 días en las mismas, los animales cambian sus ritmos biológicos a los prefijados en las cámaras (Boggio y col., 1998; Yannielli y Cardinali, 1999; Meroi y col., 2014). En nuestro caso optamos por la primera posibilidad y no se utilizaron cámaras cronobiológicas para la realización del estudio. Todos los animales estuvieron expuestos a un fotoperiodo natural, manteniendo el horario y sus ciclos naturales; al realizar el estudio en dos meses opuestos del año se logró obtener la mayor diferencia posible en la exposición a las horas de luz solar (11 horas de media al día durante el invierno y 13 horas de media al día durante el verano), temperatura, humedad y demás factores climáticos (SIGA, 2012), con el fin de poner de manifiesto la influencia de los mismos en los parámetros estudiados. Si bien este tipo de evaluación se torna más incómoda para el investigador, el cual necesita hacer las pruebas a horas consideradas no convencionales, pensamos que se altera en menor medida el “metabolismo” de los animales, por lo que los resultados reflejan lo que realmente sucede.

Debido a que los individuos correspondientes a cada especie evaluada (felinos y caninos) fueron separados del resto del grupo durante un año, se determinó la utilización sólo de ejemplares hembras de cada especie, a fin de facilitar su manejo y prevenir posibles cruzamientos reproductivos durante sus respectivos ciclos estrales. De esta forma se ha evitado la posible aplicación del criterio de exclusión correspondiente a hembras gestantes. Además, si bien no existen estudios científicos que indiquen que el sexo pudiera influir en la farmacocinética de los fármacos estudiados, se consideró en todo momento reducir al máximo la variabilidad interindividual.

Los datos referentes al peso de cada animal se actualizaban en el momento de administrar los fármacos, a fin de aplicar la dosis correcta de los mismos, determinada en mg/kg.

Todos los animales cumplieron con los parámetros determinados en los criterios de inclusión en cuanto a sanidad, tamaño uniforme, mansedumbre, correcto estado corporal y hembras no gestantes; realizándose previamente al comienzo del estudio, exámenes ecográficos para comprobar la ausencia de preñez. Dos meses antes del comienzo de la investigación, todos los animales fueron vacunados y desparasitados externa e internamente.

Puesto que las patologías podían alterar los estudios farmacológicos, se puso especial cuidado en el estado de salud de los animales. Se realizaron exámenes clínicos completos y analíticas sanguíneas (véase Anexo I). Así mismo, se llevaron a cabo controles de manera periódica durante el tiempo en que transcurrió el experimento, de manera que nos permitieran conocer si se presentaba algún problema o patología que pudiera ser objeto de exclusión, cosa que no sucedió.

Consideramos que la utilización de los 8 animales de cada especie suponía un grupo suficientemente homogéneo y en número adecuado para realizar los estudios, ya que es similar a los utilizados en otros estudios y por otros autores (Rebuelto y col., 2003; Fraga y col., 2006; Bacova y col., 2010). Si bien con 6 animales suele ser suficiente para un estudio de estas características en donde los coeficientes de variación de los parámetros analizados no son muy extensos, comenzamos con un grupo mayor de animales ante la probable necesidad de tener que descartar algún animal a lo largo de la experimentación.

Para el diseño experimental se utilizó en cada caso, un diseño aleatorio cruzado. Con el fin de evitar la presencia de residuos de los fármacos utilizados en la fase anterior y considerando que la semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) del etomidato es de $4,6 \pm 2,6$ h (Yeung y Zed, 2002) y la de midazolam 1,28 h (Maddison y col., 2004), el período de lavado entre pruebas fue de 7 días, que es superior al sugerido para este tipo de estudios, ya que se indica que los períodos de lavado deben abarcar entre 4 y 8 semividas de eliminación del fármaco objeto de estudio (Martínez, M. N., 1994). Período ampliado a 10 veces la semivida terminal de las sustancias activas o sus metabolitos en el año 2000 por la EMEA (EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL, 2000; Volume 8. Notice to applicants and Guidelines, 2005).

En los casos en los cuales se registró una saturación de oxígeno arterial (SpO_2) menor a 92% se suministró oxígeno medicinal al 99% a través de una máscara de oxigenación. No siendo necesaria otra maniobra para alcanzar los valores normales, tampoco se observaron alteraciones clínicas en estos animales.

VI.2.- Discusión del método

VI.2.1.- Protocolos y vías de administración

La frecuencia e intervalo en las mediciones se realizó de forma que se pudiera determinar la influencia del ritmo circadiano sobre un parámetro determinado y para ello es necesario tomar un número adecuado de muestras (al menos cuatro), obtenidas con intervalos de tiempo apropiados, a lo largo de un ciclo completo (Rebuelto, M., 2004). Los estudios se

realizaron en horarios extremos del ciclo circadiano (02, 08, 14, y 20 h) a fin de determinar las posibles variaciones en los parámetros estudiados con respecto los períodos de descanso/actividad y a la presencia o no, de la influencia significativa de un ritmo circadiano en estos parámetros, en las especies estudiadas.

Las experiencias se desarrollaron además, en dos estaciones extremas del año en cuanto a temperatura ambiente y cantidad de horas de luz solar, a fin de determinar la posible influencia de un ritmo circanual en los parámetros estudiados.

La dosis elegida de etomidato para la realización de nuestro estudio difiere de la recomendada para la mayoría de las especies, que es de 1 a 2,2 mg/kg de peso corporal (Ilkiw, J., 2002). Decidimos utilizar una dosis de 3 mg/kg de etomidato de forma que nos permitiera observar y cuantificar con un mayor margen, su influencia sobre los parámetros estudiados, a dosis superiores a las terapéuticas y sin que constituyera un riesgo para los animales, dado que el índice terapéutico (dosis letal/dosis hipnótica DL_{50}/DH_{50}) para el etomidato es de 16 (Ilkiw, J., 2002; Posner, L.P., 2007). De esta forma se pretendía asegurar que las posibles modificaciones producidas como consecuencia de la influencia circadiana, se manifestaran más nítidamente, forzando unos niveles plasmáticos superiores a los que el clínico maneja de forma cotidiana, teniendo en cuenta, por otro lado, la escasa incidencia del etomidato sobre las constantes hemodinámicas y cardiovasculares (Brussel y col., 1989; Thurmon y col., 2003; Posner, L.P., 2007). Con la dosis administrada de etomidato, todos los animales alcanzaron el decúbito y la inmovilización con pérdida del reflejo de retirada podal en los cuatro miembros, cumpliendo con los objetivos previstos en cuanto a conseguir un correcto y adecuado estado anestésico sin provocar problemas en ninguno de los animales.

La dosis elegida de midazolam para la realización de nuestro estudio es la recomendada para las especies estudiadas (0,045-0,2 mg/kg) (Ilkiw y col., 1998; Gross M. E., 2001; Maddison y col., 2004). De manera contraria a lo comentado anteriormente, decidimos utilizar una dosis de 0,1 mg/kg, suficiente para provocar una leve sedación de los animales, sin afectar los sistemas cardiovasculares y/o respiratorios; y con el fin de prevenir posibles efectos adversos indeseables del etomidato, como son las mioclonías (Isitemiz y col., 2014), sin que se vea afectada la duración del efecto del etomidato y con la intención de que las posibles variaciones que se apreciaran en el estudio fueran atribuidas en mayor grado (por no decir exclusivamente) al etomidato y no a esta benzodiacepina la que además, demostró no estar influenciada por los ritmos circadianos en su farmacocinética/farmacodinamia en otras especies en las que fue estudiada (Bienert y col., 2014).

El período durante el cual se tomaron los datos sobre los parámetros hemodinámicos evaluados, abarca la duración total del efecto hipnótico del etomidato (aprox. 15 minutos) (Yeung y Zed, 2002), ya que luego de este tiempo la mayoría de los animales comenzarían a despertar, imposibilitando una correcta y fidedigna medición de los valores. Los datos se tomaron a intervalos de tiempo suficiente (cada 5 minutos), para permitir detectar una posible variación entre ellos y por otro lado causar mínimos estímulos sobre los animales, con el objetivo de no inducir alteraciones sobre los parámetros hemodinámicos estudiados.

Dado que se evaluaban tanto una serie de parámetros objetivos (FC, PAD, PAM, PAS y SpO₂), así como otros más subjetivos (fases anestésicas, tiempos de inducción, inmovilización, recuperación y respuesta total), los cuales permiten una mayor influencia del observador, todas las mediciones fueron realizadas siempre por el mismo operador y al igual que en otros estudios similares, se han tomado como límites de cada fase reacciones anestésicas definibles y determinantes, como son la pérdida y la recuperación del reflejo de retirada podal para determinar el estado anestésico (Bienert y col., 2014) y la marcha normal para determinar la recuperación anestésica total (Rebuelto y col., 2003).

VI.3.- Discusión de los resultados

VI.3.1- Parámetros anestésicos en gatas

VI.3.1.1.- Variaciones circadianas en invierno

Los felinos domésticos son considerados como animales con actividad nocturna, sin embargo al estar en contacto con los seres humanos, pueden existir alteraciones en sus períodos de descanso/actividad provocadas entre otros factores, por los períodos de alimentación y aseo de su hábitat (Randall, W. y col., 1985). En las gatas estudiadas durante el mes de agosto (invierno), observamos una variación estadísticamente significativa ($p=0,028$) en el tiempo de inmovilización determinado a las 14:00 h (período de descanso) con respecto al determinado a las 20:00 h. (período de actividad) (Tabla V.13), con un coincidente comportamiento circadiano, el cual registró una acrofase a las 10:27 h. (Gráfico V.2). Estos resultados indican un posible aumento en la sensibilidad de los receptores GABA_A del sistema nervioso central a estos agentes anestésicos durante el período de descanso (diurno en esta especie), de acuerdo con lo publicado por otros autores en otras especies estudiadas (Sato, Y. y col., 2005; Vale, N.B. y col., 2009).

Se observó una aparente influencia del mayor tiempo de inmovilización en la duración de la respuesta total anestésica, registrándose un aumento en la duración de la respuesta total estadísticamente más significativo ($p=0,0113$), en la determinación de las 8:00 h con respecto a la de las 20:00 h, (Tabla V.17), con una acrofase a las 09:13 h. (Gráfico V.4). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de recuperación anestésica en los diferentes horarios estudiados (Tabla V.15). Sin embargo, la curva circadiana del tiempo de recuperación (Gráfico V.3) registró una acrofase a las 08:41 h, lo cual manifiesta un comportamiento circadiano de este parámetro similar a los otros parámetros estudiados. Estos datos coinciden con lo expresado por otros autores con respecto a una mayor actividad GABAérgica cerebral y una disminución en el metabolismo hepático a través de las enzimas del citocromo P450 durante los períodos de descanso (Vale y col., 2009; Ohdo, S., 2010). Manifestando consecuentemente, una mayor duración en los efectos anestésicos en los horarios diurnos (período de descanso) en los gatos.

A partir de nuestros datos, y al no disponer de las concentraciones plasmáticas del etomidato y del midazolam, no podemos discernir si los resultados observados se deben a un

incremento en estas concentraciones y que serían atribuibles a un descenso de la capacidad metabólica; o bien a una mayor sensibilidad de los receptores GABA_A a estos agentes anestésicos como consecuencia de las variaciones circadianas, e incluso a una combinación de ambas, como parece más lógico, en función de las aportaciones realizadas por los autores anteriormente mencionados (Sato y col., 2005; Vale y col., 2009; Ohdo, S., 2010).

VI.3.1.2.- Variaciones circadianas en verano

A diferencia de lo que acabamos de comentar en los horarios de invierno, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la duración de los períodos de inducción, inmovilización, recuperación ni en la respuesta total anestésica en los diferentes horarios estudiados durante el mes de febrero (verano) (véase anexo II). Esta ausencia de influencia circadiana podría estar dada por una mayor duración de las horas de luz en esta estación. Esta prolongación de las horas de luz se traduce en cambios en las concentraciones de melatonina (mayor luminosidad, menor producción de melatonina); la menor cantidad de melatonina secretada durante los días de mayor luminosidad sería la responsable de provocar un menor efecto cronobiótico sobre los ritmos biológicos, y consecuentemente sobre los períodos de descanso/actividad (Arendt, J., 1998; Smolensky y Peppas, 2007; Ebling, F. J. P., 2010), influyendo este hecho en la sensibilidad del sistema nervioso central a este tipo de agentes anestésicos en esta época del año (Sato y col., 2005; Vale y col., 2009).

El análisis del comportamiento circadiano de estos parámetros, demostró que la acrofase se produce durante los horarios diurnos para los tiempos de inducción (13:30 h) (Gráfico V.5), inmovilización (13:30) (Gráfico V.6) y respuesta total (8:41 h) (Gráfico V.8). Coincidiendo los mayores tiempos en el estado de hipnosis anestésica con lo expresado anteriormente para los horarios de invierno. Sin embargo, y a diferencia del estudio realizado en invierno, durante el verano se produjo el mayor tiempo de recuperación anestésica (acrofase) durante la fase de actividad (05:00 h) (Gráfico V.7), esto podría deberse a que la presencia de estudiantes y el movimiento de personal en general alrededor de los gatiles comienza más temprano y finaliza más tarde en los meses de verano, lo que se traduce también en una mayor actividad diurna en el hábitat de los gatos, pudiendo cambiar, involuntariamente sus horarios de alimentación y aseo acordes con sus características etológicas. Estos cambios, de alguna manera, pueden inducir a los gatos a variar algunos de sus ritmos biológicos, tal como describió Randall y col. (1985), modificándose la capacidad metabólica de estos fármacos durante los períodos de descanso/actividad.

VI.3.1.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano

Con respecto a la comparación realizada entre dos estaciones extremas del año, con el fin de evaluar la incidencia de la cantidad de horas de luz solar en los parámetros anestésicos estudiados, observamos una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0001$) entre invierno y verano en el tiempo de inmovilización durante la anestesia (Tabla V.14), así como en el tiempo

de recuperación anestésica ($p=0,0107$) (Tabla V.16) y en el tiempo de respuesta total a la anestesia ($p=0,0024$) (Tabla V.18), registrándose un mayor tiempo en la duración de estos parámetros en el mes de agosto (invierno) con respecto al mes de febrero (verano) (véase anexo II) (Gráfico VI.1).

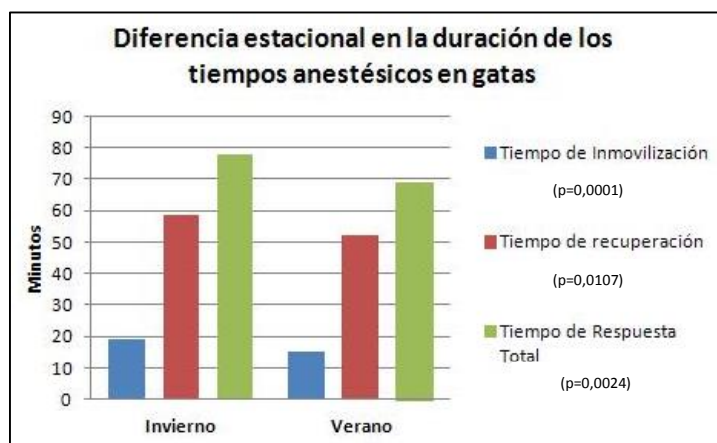


Gráfico VI.1.- Diferencias en los tiempos de anestesia registrados en las gatas, entre las estaciones de invierno y verano.

Esto puede estar influenciado, como expresamos anteriormente, por la mayor secreción de melatonina en la época invernal por lo tanto, al haber menor cantidad de horas de luz durante el invierno (y mayor secreción de melatonina) se ven afectados los diferentes ritmos circadianos (Arendt, J., 1998; Smolensky y Peppas, 2007; Ebling, F. J. P., 2010), incidiendo este hecho en la farmacocinética/farmacodinamia de la combinación anestésica midazolam-etomidato.

VI.3.2.- Parámetros hemodinámicos en gatas

Durante el tiempo en que los animales estuvieron bajo los efectos anestésicos del etomidato, los registros de frecuencia cardíaca y de presión arterial diastólica, media y sistólica se mantuvieron dentro de los intervalos considerados normales para esta especie (Vivo Rodríguez, R., 1995). En concordancia con lo expresado por otros autores (Brussel y col., 1989; Thurmon y col., 2003; Posner, L.P., 2007), el etomidato mantuvo en todo momento una estabilidad en el funcionamiento del sistema cardiovascular de las gatas estudiadas.

VI.3.2.1.- Variaciones circadianas en invierno

No se registraron variaciones, estadísticamente significativas, en la frecuencia cardíaca (FC) a lo largo del día entre los horarios estudiados durante el mes de agosto (Tabla V.29), tanto para el período de preinducción anestésica como durante el período en el cual los animales estaban bajo los efectos de los fármacos (véase anexo II), permaneciendo todos los valores dentro de los intervalos normales para la especie (Vivo Rodríguez, R., 1995). Sin embargo, se observó una modificación en las curvas circadianas de la frecuencia cardíaca entre el período preanestésico con respecto al período postanestésico de las gatas (Gráfico V.9). En el período

previo a la administración de los fármacos (preinducción), la acrofase se registró a las 06:24 h, considerando que durante el mes de agosto en esta latitud del hemisferio sur, el sol sale a las 08:00 h y se pone a las 19:00 h (The Weather Channel Lwc., 2013), la misma se produjo durante la fase de actividad de los animales, que como dijimos, se produce en horarios nocturnos en la especie felina, coincidiendo con estudios previos en los cuales se determinó la presencia de ritmos circadianos en los parámetros hemodinámicos de los seres vivos (Chassard y Bruguerolle, 2004; Smolensky y Peppas, 2007), en los cuales la mayor frecuencia cardíaca se produce, en la mayoría de las especies domésticas y en los seres humanos, durante los períodos de actividad (Piccione y col., 2005).

Las acrofases correspondientes a los tres períodos de medición de la frecuencia cardíaca postinducción (5, 10 y 15 minutos) se registraron en horarios vespertinos (17:00 h; 18:33 h y 20:26 h respectivamente) (Gráfico V.9), totalmente opuestas a la registrada en la preinducción (unas 12 horas aproximadamente), lo cual permite suponer que el etomidato produjo un efecto cronobiótico sobre el sistema nervioso central, al igual que lo demostrado con otros agentes anestésicos (Challet y col., 2007).

Se registró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de presión arterial diastólica (PAD) en las determinaciones realizadas a los 5 minutos postinducción anestésica ($p=0,0403$), entre el registro de las 08:00 h, con respecto al de las 02:00 h (Tabla V.31), si bien se mantenían estos valores dentro de los intervalos normales correspondientes a esta especie (Tibaduiza y Benavides, 2006). Los comportamientos circadianos de las determinaciones de PAD indican una variación en las acrofases entre las mediciones realizadas durante al período de anestesia, con un comportamiento dispar durante el efecto anestésico del etomidato, siendo relativamente paralelo entre los 5 y 15 minutos, pero opuesto a lo que sucedió en la medición de los 10 minutos (Gráfico V.10). Este comportamiento es difícil de explicar ya que va en contra de lo que sucede con las PAM y PAS, cuyos comportamientos son más parecidos a lo largo de los tres tiempos de determinación de los que acontecen a los 5 y 15 min de esta PAD, e incluso coincidentes con las determinaciones de las frecuencias cardíacas postinducción (Gráfico V.9).

La presión arterial media (PAM) y la presión arterial sistólica (PAS) no mostraron variaciones estadísticamente significativas entre los diferentes horarios estudiados durante el día (Tablas V.33 y V.35), manteniéndose siempre dentro de los valores normales para la especie (Tibaduiza y Benavides, 2006). Las curvas de comportamiento circadiano para estos parámetros mantuvieron un patrón similar en los diferentes momentos de registro durante la anestesia y expresaron sus correspondientes acrofases en horarios propios al atardecer, que es el comienzo del período de actividad en esta especie (Gráficos V.11 y V.12). Al igual que lo descrito en los seres humanos (Anwar y White, 1998), en los gatos los valores más altos (acrofases) de las diferentes presiones arteriales (PAD, PAM y PAS), se registraron generalmente durante el comienzo del período de actividad.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los niveles de saturación de oxígeno arterial (SpO_2) a los 5, 10 y 15 minutos luego de la administración de los fármacos, entre los diferentes

horarios estudiados en invierno no manifestaron diferencias estadísticamente significativas entre sus valores (Tabla V.37). Los valores se mantuvieron dentro de los intervalos normales para esta especie (Capaul, E. G., 1995), lo que se correlaciona con otros trabajos realizados, en que se pone de manifiesto la ausencia de alteraciones con manifestación clínica en el sistema respiratorio provocadas por la anestesia con etomidato (Posner, L.P., 2007). El comportamiento circadiano de este parámetro hemodinámico fue similar en las diferentes mediciones realizadas dentro del estado de anestesia (5, 10 y 15 min.), registrándose las correspondientes acrofases en horarios nocturnos (02:00 h, 05:00 h y 08:00 h respectivamente) (Gráfico V.13), dentro del período de actividad, lo que supone una mayor depresión en los parámetros respiratorios y de oxigenación sanguínea durante el período de descanso de esta especie. Este comportamiento fue similar a lo manifestado por la frecuencia cardíaca previa a la inducción anestésica e inverso a lo sucedido con las presiones arteriales diastólica, media y sistólica. La mayor saturación de oxígeno está en concordancia con lo expresado en otros trabajos realizados sobre la adaptación del organismo a las necesidades de mayores niveles de actividad mientras se está despierto (Guo y Stein, 2003).

VI.3.2.2.- Variaciones circadianas en verano

Al igual que en el estudio realizado en invierno, no se registraron variaciones estadísticamente significativas en la frecuencia cardíaca (FC) a lo largo del día entre los horarios estudiados durante el mes de febrero (Tabla V.30), para el período de preinducción anestésica como durante el período en el cual los animales estaban bajo los efectos de los fármacos (véase anexo II). A diferencia de lo que sucedía en el invierno, en donde la FC preinducción tenía diferente comportamiento circadiano a la FC postinducción, en verano las diferentes mediciones de frecuencias cardíacas (preinducción y a los 5, 10 y 15 minutos postinducción) presentaron una acrofase diurna (17:00 h, 12:46 h, 11:00 h y 14:56 h respectivamente) (Gráfico V.14), si bien el valor correspondiente a la acrofase de preinducción fue más tardío y más elevado que los valores de las acrofases postinducción, así mismo todos los valores de FC se mantuvieron dentro de los valores de referencia para la especie (Vivo Rodríguez, R., 1995).

La presión arterial diastólica (PAD), no mostró variaciones estadísticamente significativas entre los diferentes horarios estudiados durante el día en verano (Tabla V.32). El comportamiento circadiano, al igual que lo sucedido en el invierno, fue dispar durante el efecto anestésico del etomidato, siendo relativamente paralelo entre los 5 y 15 minutos, pero opuesto en la medición de los 10 minutos (Gráfico V.15), manifestando acrofases nocturnas (durante el período de actividad) en las mediciones a los 5 y 15 minutos postinducción (21:47 h y 23:50 h respectivamente), que expresan un ritmo circadiano correspondiente con los períodos de descanso/actividad (Chassard y Bruguerolle, 2004; Smolensky y Peppas, 2007), pero una acrofase diurna (08:00 h) en la medición realizada a los 10 minutos postinducción. Como indicamos anteriormente, este comportamiento es difícil de explicar, ya que va en contra de lo que sucede con las PAM y PAS, cuyos comportamientos son más parecidos a lo largo de los tres tiempos de determinación de los que acontecen a los 5 y 15 min de esta PAD.

La presión arterial media (PAM) y la presión arterial sistólica (PAS) no mostraron variaciones, estadísticamente significativas, entre los diferentes horarios estudiados durante el día en verano (Tablas V.34 y V.36), manteniéndose siempre dentro de los valores normales para la especie (Tibaduiza y Benavides, 2006). Este hecho es análogo a lo sucedido en invierno, donde las curvas de comportamiento circadiano para estos parámetros mantuvieron un patrón similar en los diferentes momentos de registro durante la anestesia y expresaron sus correspondientes acrofases en horarios del período de actividad en esta especie (Gráficos V.16 y V.17). La PAM determinada a los 10 minutos postinducción, manifestó una acrofase diurna (16:27 h), similar al registro de PAD en ese tiempo (08:00 h). Se observó que las curvas circadianas de los diferentes tiempos de medición (5, 10 y 15 minutos) se hacen más paralelas en la PAM y en la PAS con respecto a la de la PAD (Gráficos V.15, V.16 y V.17). A los 10 minutos postinducción se registró el mayor desfase circadiano en la PAD, pero no a los 5 o a los 15 minutos postinducción, y sólo se produjo en la PAD. Posteriormente las curvas se hacen más paralelas en la PAM, para quedar bien paralelas en la PAS.

Esto se puede explicar debido a los desfases entre PK/PD propios del etomidato, ya que si bien la concentración máxima del fármaco en el sistema nervioso central es relativamente rápida (alrededor de 1 minuto) (Yeung y Zed, 2002), el máximo efecto anestésico se demora un tiempo mayor, debido al desfase entre la relación concentración/efecto del fármaco (Figura VI.1). Este desfase entre el tiempo de distribución inicial y el máximo efecto anestésico ejercería su efecto en las curvas circadianas de la PAD, de modo que a los 10 minutos es cuando el efecto anestésico del etomidato es máximo (dentro de los tiempos medidos por nosotros), por lo tanto es en este tiempo cuando ejercería su mayor efecto cronobiótico sobre la PAD, en cambio a los 5 minutos este efecto es menor, ya que si bien la concentración plasmática es alta, el efecto anestésico aun no está en su máximo nivel, y a los 15 minutos postinducción, al ser este un fármaco que posee un metabolismo rápido, su concentración en el sistema nervioso central comienza a descender, no ejerciendo el efecto cronobiótico sobre la PAD en este tiempo. Este efecto cronobiótico se observa en mayor medida en la presión arterial diastólica, en menor medida en la presión arterial media y no se observó en la presión arterial sistólica en las gatas.

Por otro lado, la PAD está más influenciada por la FC que la PAS, a su vez, la PAM está determinada en un 60 % por la PAD y en un 40 % por la PAS (Guyton y Hall, 2006), esto explicaría la mayor concordancia entre las acrofases de la FC a los 10 minutos postinducción (11:00 h) con la acrofase de la PAD y la PAM a los 10 minutos postinducción (08:00 h y 16:27 h respectivamente) (Gráficos V.14, V.15 y V.16).

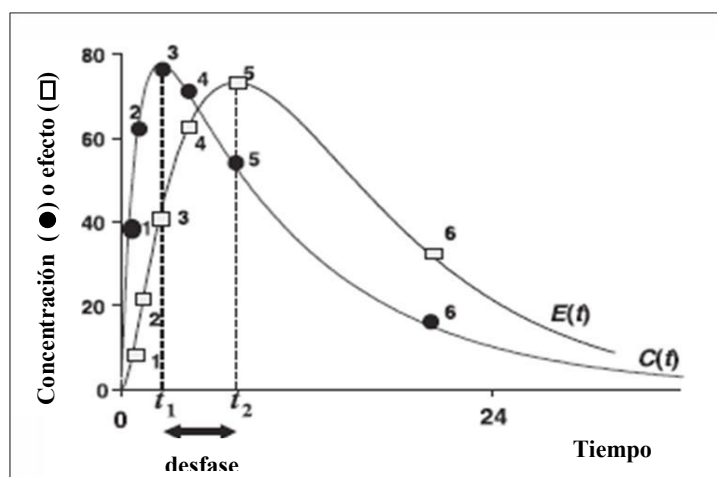


Figura VI.1.- Desfase entre concentración/efecto (PK/PD) en los fármacos.

Sin embargo, en general, el comportamiento circadiano para los parámetros correspondientes a PAD, PAM y PAS, al igual que lo registrado en invierno, expresó fundamentalmente sus correspondientes acrofases en horarios coincidentes con el período de actividad en esta especie (Gráficos V.15, V.16 y V.17). De manera similar a lo descrito en los seres humanos (Anwar y White, 1998).

Si consideramos que la mayor FC se corresponde con los horarios de mayor actividad en gran parte de las especies animales (Piccione y col., 2005); en el caso de las gatas evaluadas durante el verano, en las que la acrofase de la FC preinducción se produjo en horarios diurnos, factores ambientales tales como la mayor cantidad de horas de luz (13 horas medias de luz solar al día) en esta estación pudieron desplazar la curva circadiana de la FC, aumentando la actividad de los animales en los horarios diurnos, no incidiendo este aumento en la presión arterial. Otra posibilidad es que, como explicamos anteriormente, durante esta época del año la actividad medioambiental cerca de los gatiles es mayor, por lo que puede haber impedido un correcto desarrollo del período de descanso en los animales, que podría haber producido un aumento del estrés en los mismos y un consecuente aumento de la frecuencia cardíaca en estos horarios.

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación de los niveles de saturación de oxígeno arterial (SpO₂) tras la administración de los fármacos entre los diferentes horarios estudiados en verano, se observaron diferencias, estadísticamente significativas, entre el registro de las 02:00 h (período de actividad) y los valores registrados en los demás horarios (08:00 h, 14:00 h y 20:00 h) a los 10 minutos postinducción anestésica ($p=0,0008$) (Tabla V.38), y entre los de las 02:00 h (período de actividad) y los de las 14:00 h y 20:00 h (período de descanso), a los 15 minutos postinducción anestésica ($p=0,0007$) (Tabla V.38) (véase anexo II).

Durante el período de actividad (02:00 h) los valores registrados de SpO₂ fueron inferiores durante la etapa anestésica, si bien sólo existió una diferencia estadísticamente significativa entre las mediciones realizadas a los 10 y 15 minutos postinducción, a los 5 minutos también se pudo observar una diferencia (menos marcada y no significativa estadísticamente)

entre el período de actividad y el período de descanso (Gráfico VI.2). En el estudio realizado en el horario de las 02:00 h, algunos animales incluso, requirieron una suplementación de oxígeno medicinal al 99%, a través de una máscara de oxigenación, para que no se produjeran daños en el organismo a causa de la hipoxia, cuando los valores fueron inferiores a 92 % (siguiendo los criterios de exclusión expuestos).

Considerando que el etomidato puede provocar una depresión temporal en los centros medulares que modifican el impulso ventilatorio en respuesta a las tensiones cambiantes de CO₂ (Vanlersberghe y Camu, 2008), nuestros resultados demuestran que ante una mayor demanda de oxígeno durante el período de actividad (02:00 h), el etomidato pudo provocar un mayor efecto depresor sobre estos centros de control respiratorio de los animales en el verano. En invierno, este hecho no fue tan marcado como en verano, sin producirse diferencias estadísticamente significativas entre los distintos horarios estudiados, probablemente porque en el invierno la demanda de oxígeno durante los horarios nocturnos (período de actividad) fue menor, debido a que los animales tuvieron menor actividad física durante su período de actividad a causa de las bajas temperaturas que se registran durante la noche. Sin embargo, pudo observarse también, una mayor depresión de este parámetro en el comienzo del período de actividad (20:00 h) (Gráfico VI.3), aunque como dijimos, sin registrarse diferencias estadísticamente significativas (Tabla V.37).

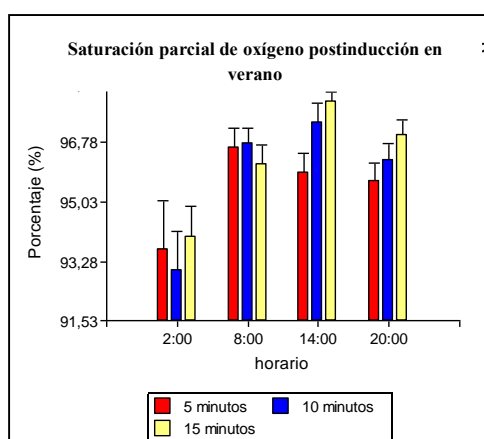


Gráfico VI.2.- Porcentaje de saturación de oxígeno arterial (SpO₂) luego de la administración de los fármacos entre los diferentes horarios estudiados en verano en las gatas.

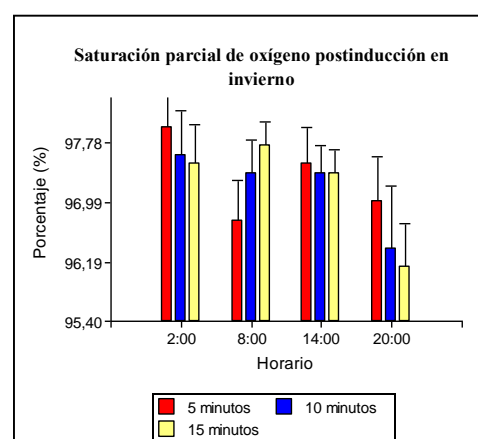


Gráfico VI.3.- Porcentaje de saturación de oxígeno arterial (SpO₂) luego de la administración de los fármacos entre los diferentes horarios estudiados en invierno en las gatas.

El comportamiento circadiano de este parámetro hemodinámico estudiado en verano, registró sus correspondientes acrofases en horarios diurnos (12:13 h, 13:30 h y 14:56 h) (Gráfico V.18) en las mediciones realizadas a los 5, 10 y 15 minutos respectivamente, dentro del período de descanso. Lo que concuerda con lo expresado anteriormente en cuanto a que los mayores registros de saturación de oxígeno postanestesia se registraron durante los horarios diurnos en las gatas.

VI.3.2.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en los valores de los parámetros hemodinámicos estudiados entre los meses de invierno y verano (véase anexo II). Sin embargo se observaron ritmos circadianos diferentes en la FC y en la SpO₂, en invierno y en verano, las acrofases se manifestaron en diferentes momentos del día en las 2 estaciones evaluadas, lo que supone una influencia importante de factores ambientales en los ritmos circadianos de estos parámetros hemodinámicos en estos animales. Mientras que en invierno, se encuentran bien definidas las acrofases de estos parámetros durante el período de “actividad”, en verano no lo están, esto se pone de manifiesto al tener acrofases de FC y SpO₂ en períodos de “descanso”, cuando deberían encontrarse en los períodos de “actividad”.

Coincidiendo este comportamiento con lo sucedido en la evaluación de los diferentes parámetros anestésicos estudiados en las gatas; puede hacernos suponer que la mayor cantidad de horas de luz en verano, con la consecuente menor liberación de melatonina durante los horarios nocturnos (Arendt, J., 1998; Smolensky y Peppas, 2007; Ebling, F. J. P., 2010), podría impactar en menos cantidad de horas de sueño durante el período de descanso de estos animales, modificándose el ritmo circadiano de la FC y la SpO₂ durante el verano. No influyendo este hecho en las diferentes presiones arteriales (PAD, PAM y PAS), que mantienen un ritmo normal.

VI.3.3- Parámetros anestésicos en perras

VI.3.3.1.- Variaciones circadianas en invierno

Los perros son considerados cronobiológicamente como animales con actividad diurna (Bekoff y col., 1984), En las perras estudiadas durante el mes de agosto (invierno) observamos una diferencia, estadísticamente significativa ($p=0,0009$), en el tiempo de recuperación anestésica, siendo mayor a las 08:00 h (comienzo del período de actividad), que el determinado en los otros horarios (Tabla V.53). El incremento de duración de este parámetro tuvo como consecuencia un aumento en el registro del tiempo de respuesta total a la anestesia en el horario de las 08:00 h; estableciendo una diferencia, estadísticamente significativa ($p=0,0020$), de los valores en este horario con respecto a los otros estudiados (Tabla V.55) (Véase anexo III). No se detectaron diferencias, estadísticamente significativas, en el tiempo de inmovilización de los animales bajo los efectos de la anestesia (Tabla V.51).

El comportamiento circadiano del tiempo de recuperación anestésica manifestó una acrofase a las 07:39 h (Gráfico V.21) y el de la respuesta total anestésica presento una acrofase a las 06:53 h (Gráfico V.22). Estos hechos demuestran que, el mayor tiempo de recuperación de los animales tras la anestesia se produjo coincidentemente con el período de descanso de los mismos.

Así mismo, los datos obtenidos en nuestro estudio concuerdan con lo expresado por otros autores con respecto a una mayor actividad GABAérgica cerebral y una disminución en el metabolismo hepático a través de las enzimas del citocromo P450 durante los períodos de descanso (Vale y col., 2009; Ohdo, S., 2010). Manifestando, consecuentemente, una mayor duración en los efectos anestésicos en los horarios nocturnos (período de descanso) en los perros.

VI.3.3.2.- Variaciones circadianas en verano

En las perras estudiadas durante el mes de febrero (verano) observamos una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0269$) en el tiempo de respuesta total a la anestesia, entre las 08:00 h y las 20:00 h (Tabla V.56). Con una acrofase de la curva circadiana registrada a las 06:13 h (Gráfico V.26). En los otros tiempos anestésicos estudiados se registraron acrofases correspondientes también a horarios nocturnos, destacándose el tiempo de inmovilización a las 05:00 h (Gráfico V.24) y el tiempo de recuperación a las 06:37 h (Gráfico V.25), todas las acrofases se registraron durante el período de descanso de los animales.

Aunque todos los tiempos evaluados en verano registraron sus mayores valores (medias) en horarios nocturnos (Véase anexo III), y si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de inmovilización y el tiempo de recuperación anestésica, estos parámetros pueden haber ejercido una influencia en el incremento de la duración del tiempo anestésico en ese horario (tiempo de respuesta total). De manera similar a lo acontecido con las gatas estudiadas, en las perras a partir de nuestros datos y al no disponer de las concentraciones plasmáticas de etomidato y midazolam, no podemos discernir si los efectos observados se deben a un incremento en estas concentraciones, que serían atribuibles a un descenso de la capacidad metabólica, o bien a una mayor sensibilidad en los receptores GABA_A a estos agentes anestésicos como consecuencia de las variaciones circadianas, e incluso a una combinación de ambas, como parece más lógico en función de las aportaciones realizadas por los autores anteriormente mencionados (Sato y col., 2005; Vale y col., 2009; Ohdo, S., 2010).

VI.3.3.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano

Con respecto a la comparación realizada entre dos estaciones extremas del año, con el fin de evaluar la incidencia de la cantidad de horas de luz solar en los parámetros anestésicos estudiados, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los valores correspondientes al tiempo de inducción (Tabla V.50), al tiempo de inmovilización (Tabla V.52), al tiempo de recuperación (Tabla V.54) y al tiempo de respuesta total anestésica (Tabla V.56) entre las estaciones de invierno y verano (Véase anexo III); indicando una baja influencia de la cantidad de horas de luz durante el día en los ritmos circadianos de los parámetros anestésicos evaluados en estos animales. Por lo que consideramos que no se ve afectada la farmacocinética/farmacodinamia del etomidato-midazolam en las diferentes estaciones del año evaluadas.

VI.3.4.- Parámetros hemodinámicos en perras

Durante el tiempo en que los animales estuvieron bajo los efectos anestésicos del etomidato, los registros de frecuencia cardíaca y de presión arterial diastólica, media y sistólica se mantuvieron dentro de los intervalos considerados normales para esta especie (Vivo Rodríguez, R., 1995). En concordancia con lo expresado por otros autores (Brussel y col., 1989; Posner, L.P., 2007; Thurmon y col., 2003), el etomidato mantuvo en todo momento una estabilidad en el funcionamiento del sistema cardiovascular de las perras estudiadas.

VI.3.4.1.- Variaciones circadianas en invierno

Se registró una variación estadísticamente significativa en la frecuencia cardíaca (FC) de las perras determinada a los 5 minutos postinducción anestésica, entre las 02:00 h y las 20:00 h ($p=0,0368$), durante el mes de agosto (Tabla V.67) (véase anexo III). El comportamiento circadiano de este parámetro coincidió con esta observación, registrándose curvas bastante paralelas en los diferentes tiempos de anestesia estudiados (preinducción y 5, 10 y 15 minutos postinducción), con acrofases registradas en horarios diurnos (16:56 h, 14:37 h, 11:12 h y 11:23h respectivamente) y batifases (tiempos correspondientes a los valores mínimos de la variable) durante los horarios nocturnos (Gráfico V.27). Esto representa una influencia del ritmo circadiano en los valores de FC, siendo menores los registros durante el período de descanso de estos animales, coincidiendo con lo expresado por otros autores en cuanto a un menor registro de la FC durante los períodos de descanso, expresando este parámetro un ritmo circadiano que se corresponde con los períodos de descanso/actividad (Chassard y Bruguerolle, 2004; Piccione y col., 2005; Smolensky y Peppas, 2007).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de presión arterial diastólica (PAD) registrados a los 5 minutos postinducción ($p=0,015$) y a los 10 minutos postinducción ($p=0,0492$), entre las 14:00 h y las 20:00 h (Tabla V.69) (Véase anexo III). El comportamiento circadiano de este parámetro expresó sus acrofases a las 11:39 h, 11:00 h y 13:14 h para las determinaciones correspondientes a los 5, 10 y 15 minutos postinducción anestésica, encontrándose todas durante el período de actividad (Gráfico V.28).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de presión arterial media (PAM) registrados a los 5 minutos postinducción ($p=0,0026$) entre todos los horarios evaluados y a los 10 minutos postinducción ($p=0,0245$), entre las 14:00 h y las 20:00 h (Tabla V.71) (Véase anexo III). El comportamiento circadiano de este parámetro expresó sus acrofases a las 11:23 h, 09:57 h y 11:09 h para las determinaciones correspondientes a los 5, 10 y 15 minutos postinducción anestésica respectivamente, encontrándose todas durante el período de actividad (Gráfico V.29).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de presión arterial sistólica (PAS) registrados a los 10 minutos postinducción ($p=0,0259$) y a los 15 minutos postinducción ($p=0,0262$), entre las 20:00 h y los otros horarios de determinación (02:00 h, 08:00

h y 14:00 h) (Tabla V.73) (Véase anexo III). El comportamiento circadiano de este parámetro expresó sus acrofases a las 08:26 h, 08:45 h y 08:34 h para las determinaciones correspondientes a los 5, 10 y 15 minutos postinducción anestésica respectivamente, encontrándose todas en el comienzo del período de actividad (Gráfico V.30).

Esto está en concordancia con lo expresado por otros autores (Chassard y Bruguerolle, 2004; Smolensky y Peppas, 2007) en cuanto a que la variación de las diferentes presiones arteriales se corresponden con un ritmo circadiano de descanso/actividad, coincidiendo los mayores registros de PAD, PAM y PAS con el período de actividad de los animales (horarios diurnos para esta especie). Ejerciendo el etomidato una mayor depresión de estos parámetros hemodinámicos en los horarios donde comienza el período de descanso en los perros (aprox. 20:00 h), período en el cual, a su vez, los registros de PAD, PAM y PAS se encontraban en sus batifases (valores más bajos) dentro de la curva circadiana (Gráficos V.28, V.29 y V.30).

Los resultados obtenidos en la evaluación de los niveles de saturación de oxígeno arterial (SpO_2) no manifestaron diferencias estadísticamente significativas (véase anexo III) luego de la administración de los fármacos entre los diferentes horarios estudiados en invierno en las perras. El comportamiento circadiano de este parámetro, evidenció las acrofases de los diferentes tiempos de determinación postinducción (5, 10 y 15 minutos), durante horarios diurnos (08:00 h, 14:00 h y 11:00 h respectivamente) (Gráfico V.31), esto expresa que los mayores niveles de saturación de oxígeno arterial luego de la inducción anestésica con etomidato, se producen durante el período de actividad en esta especie, coincidiendo con otros autores en que los organismos se adaptan a las necesidades de mayores niveles de actividad mientras los individuos estén despiertos (Guo y Stein, 2003).

A diferencia de las gatas, en las cuales sólo algunas requirieron suplementación de oxígeno durante el período anestésico, con respecto a las perras, varios animales luego de la inducción anestésica requirieron una suplementación de oxígeno medicinal al 99% a través de una máscara de oxigenación, de manera que no se produjeran daños en el organismo a causa de la hipoxia, cuando los valores fueron inferiores a 92 % (siguiendo los criterios de exclusión expuestos). Registrándose los menores porcentajes de saturación de oxígeno arterial en las perras estudiadas en invierno, durante los primeros minutos postinducción (Gráfico VI.4).

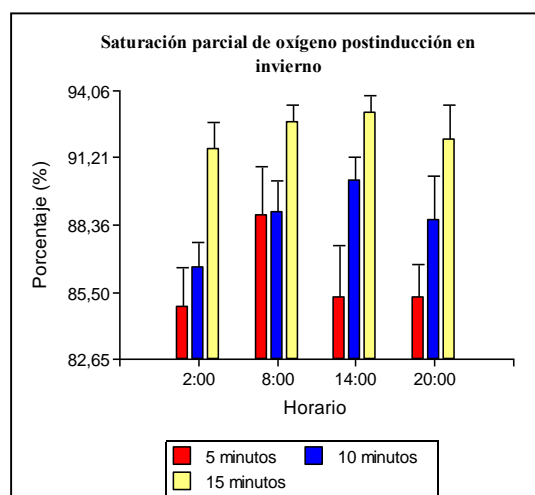


Gráfico VI.4.- Porcentaje de saturación de oxígeno arterial (SpO_2) luego de la administración de los fármacos entre los diferentes horarios estudiados en invierno en las perras.

Considerando que el etomidato puede provocar una depresión temporal en los centros medulares que modifican el impulso ventilatorio en respuesta a las tensiones cambiantes de CO_2 (Vanlersberghe y Camu, 2008), nuestros resultados demuestran que el etomidato provocó un marcado efecto depresor sobre estos centros de control respiratorio en las perras, durante los primeros minutos postinducción.

VI.3.4.2.- Variaciones circadianas en verano

No se registraron variaciones estadísticamente significativas en las determinaciones de frecuencia cardíaca (FC) realizadas a los 5, 10 y 15 minutos postinducción anestésica entre los diferentes horarios del día, en las perras evaluadas durante el mes de febrero (Tabla V.68) (Véase anexo III). El comportamiento circadiano de este parámetro evidenció una acrofase durante la preinducción anestésica a las 03:27 h (período de descanso), mientras que las acrofases correspondientes a los 5, 10 y 15 minutos postinducción anestésica se registraron a las 18:14 h, 08:00 h y 06:30 h respectivamente (Gráfico V.32), existiendo un comportamiento circadiano bastante dispar entre los diferentes horarios evaluados. Este comportamiento pudo ser consecuencia de las mayores variaciones individuales (desvíos estándares) que algunos animales tuvieron en su frecuencia cardíaca, luego de la inducción anestésica (Tabla V.62), desplazando probablemente la media de los otros animales. Además, también pudieron influir en este parámetro las variaciones ambientales que se producen durante el verano en los caniles, tal como sucedió con las gatas, habiendo mayor actividad alrededor de los animales ante una mayor cantidad de horas de luz solar en el verano. Este aumento de actividad en horarios de “descanso” puede producir un aumento del estrés en los animales. El estrés en estos animales puede llevar a un aumento de la frecuencia cardíaca (Hoglund y col., 2012).

Los cambios en el hábitat de los animales, pueden ser los causantes de una alteración en los períodos de descanso/actividad, con la consecuente modificación en sus ritmos biológicos.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de presión arterial diastólica (PAD) registrados a los 15 minutos postinducción ($p=0,0171$) entre las 08:00 h y las 02:00 h (Tabla V.70) (Véase anexo III). El comportamiento circadiano de este parámetro expresó sus acrofases a las 14:45 h, 16:34 h y 23:33 h correspondientes a las determinaciones realizadas a los 5, 10 y 15 minutos, respectivamente (Gráfico V.33), registrándose un comportamiento dispar de las acrofases con respecto a los períodos de descanso/actividad; ya que a los 5 y 10 minutos postinducción anestésica, las acrofases fueron durante el período de actividad, mientras que a los 15 minutos postinducción anestésica, la acrofase se registro en el comienzo del período de descanso. Al poseer la PAD una alta influencia por parte de la FC las alteraciones en la FC de algunos animales pudieron afectar también a la PAD.

La presión arterial media (PAM) y la presión arterial sistólica (PAS) no mostraron variaciones estadísticamente significativas entre los diferentes horarios estudiados durante el día en verano (Tablas V.72 y V.74), manteniéndose siempre dentro de los valores normales para la especie (Vivo Rodríguez, R., 1995). Similar a lo sucedido con la PAD, las curvas de comportamiento circadiano para estos parámetros no mantuvieron un patrón similar en los diferentes momentos de registro durante la anestesia y expresaron sus correspondientes acrofases en horarios bastante dispares. La PAM manifestó sus acrofases correspondientes a los 5, 10 y 15 minutos postinducción a las 18:14 h, 00:46 h y 11:00 h, respectivamente (Gráfico V.34), mientras que las acrofases de las PAS determinadas a los 5, 10 y 15 minutos postinducción anestésica fueron registradas a las 11:45 h, 23:52 h y 20:10 h, respectivamente (Gráfico V.35).

Muchos estudios han demostrado la influencia de los factores ambientales (ruido, estrés,...) en la presión arterial en los seres humanos. La relación del estrés con un aumento de la presión arterial en los perros también es conocida. Hoglund y col. (2012) demostraron que la PAD y la PAS aumentaron cuando los dueños dejaron perros en la sala de examen (Mochel y col., 2013). Por lo tanto, las alteraciones en los ritmos circadianos de las diferentes presiones arteriales observadas en nuestro estudio, podrían estar influenciadas por las modificaciones ambientales en el hábitat de los animales durante el verano, lo que llevó a modificar sus períodos de descanso/actividad.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los niveles de saturación de oxígeno arterial (SpO_2), al igual que lo sucedido en invierno, no mostraron diferencias estadísticamente significativas (véase anexo III), tras la administración de los fármacos entre los diferentes horarios estudiados en verano en las perras. El comportamiento circadiano de este parámetro, evidenció las acrofases de los diferentes tiempos de determinación postinducción (5, 10 y 15 minutos), durante horarios diurnos en el mes de febrero (14:00 h, 20:10 h y 20:10 h, respectivamente) (Gráfico V.36). Esto expresa que durante el verano, los mayores niveles de saturación de oxígeno arterial luego de la inducción anestésica con etomidato, se producen durante el período de actividad en esta especie.

VI.3.4.3.- Comparación entre los horarios de invierno y verano

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia cardíaca evaluada a los 5 minutos ($p=0,0039$) a los 10 minutos ($p=0,0282$) y a los 15 minutos ($p=0,0314$) postinducción anestésica, entre invierno y verano en las perras (Tabla V.68) (Véase anexo III). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de FC preinducción entre las estaciones, lo que demuestra que en el estudio realizado en febrero (verano) el etomidato provocó una mayor depresión de este parámetro hemodinámico con respecto al estudiado en agosto (invierno) (Gráfico VI.5).

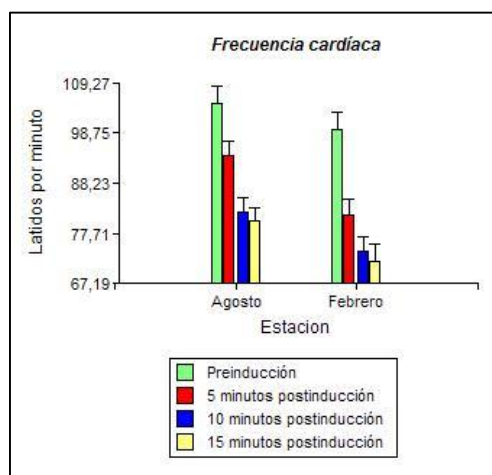


Gráfico VI.5.- Frecuencia cardíaca (FC) determinada previo y posterior a la administración de los fármacos, en diferentes meses del año en perras.

La mayor depresión en la FC durante el verano podría ser debida al incremento de la temperatura ambiental durante esta época de año. El calor puede aumentar moderadamente la frecuencia respiratoria en los perros produciendo polipnea térmica (jadeo), para permitir la termorregulación del organismo. Cuando la estimulación respiratoria es moderada, la frecuencia cardíaca suele disminuir como resultado de mecanismos reflejos primarios, los cuales activan el centro vagal bulbar, inhibiendo el nódulo sinoauricular (NSA) (López, E.F., 2007).

Si bien no se produjeron diferencias, estadísticamente significativas, en los valores registrados entre invierno y verano en las distintas presiones arteriales (Tablas V.70, V.72 y V.74), se observaron menores valores postinducción anestésica de estos parámetros hemodinámicos en el verano con respecto al invierno (Gráficos VI.6, VI.7 y VI.8). La ausencia de diferencias, estadísticamente significativas, pudo deberse a las mayores variaciones interindividuales en la especie estudiada. Probablemente, con una mayor población (superior a los 8 animales estudiados) se podría haber aclarado, la significación o haber confirmado la falta de significancia. Al no existir precisión en la significación estadística, debemos atenernos a este dato, ya que para otros parámetros, el número de animales ha sido suficiente y superior al utilizado normalmente en estudios de este tipo.

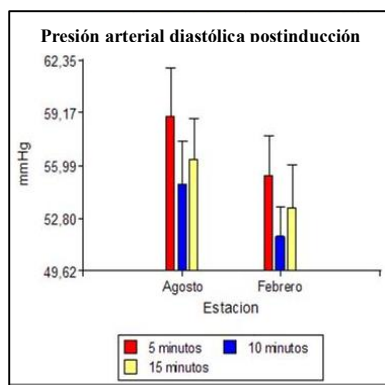


Gráfico VI.6.- PAD luego de la administración de los fármacos entre las diferentes estaciones estudiadas en verano en las perras.

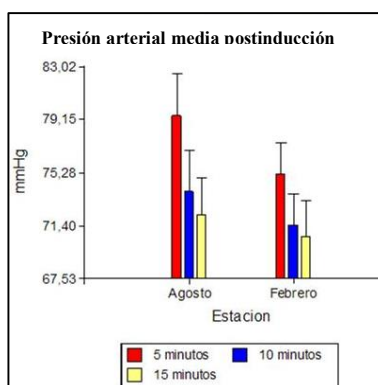


Gráfico VI.7.- PAM luego de la administración de los fármacos entre las diferentes estaciones estudiadas en verano en las perras.

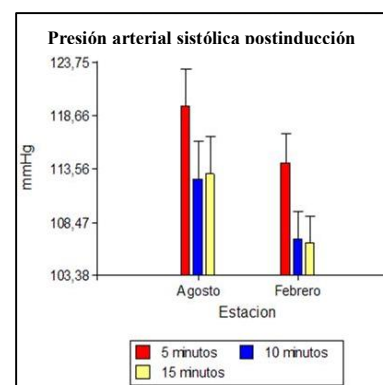


Gráfico VI.8.- PAS luego de la administración de los fármacos entre las diferentes estaciones estudiadas en verano en las perras.

Si bien los valores de las diferentes presiones arteriales se mantuvieron dentro de los intervalos normales para la especie, el mayor efecto depresor provocado por el etomidato sobre las distintas presiones arteriales se observó durante el comienzo (en invierno) o el final (en verano) del período de descanso en los animales, coincidiendo con lo estudiado en los seres humanos (Hermida y col., 2007). Sin embargo, mientras que en el invierno, las acrofases de cada presión arterial evaluada se manifestaron bien definidas en horarios bastante similares dentro del período de actividad, en verano las acrofases se manifestaron, en diferentes momentos del día. Esto puede haberse debido, como explicamos anteriormente, a una mayor influencia de factores ambientales en el verano, lo cual puede haber modificado los períodos normales de descanso/actividad en las perras.

De acuerdo a lo observado en las diferentes estaciones del año en las que se desarrolló nuestro estudio, podríamos suponer que ante una mayor cantidad de horas de luz solar durante el verano y la consecuente menor liberación de melatonina durante los horarios nocturnos (Arendt, J., 1998; Smolensky y Peppas, 2007; Ebling, F. J. P., 2010) en esta época del año, se debería haber producido una menor influencia de la capacidad cronobiológica de esta hormona sobre la modificación de ciertos parámetros hemodinámicos (por ejemplo, provocando una mayor bradicardia e hipotensión cuando su secreción fuese mayor (Chuang y col., 1993). Sin embargo, se apreció un mayor efecto depresor del etomidato sobre las constantes estudiadas en épocas en donde la secreción de la hormona es menor; por tanto consideramos que fue más factible la influencia de factores medioambientales sobre estos efectos, como por ejemplo la mayor actividad en el entorno de estos animales, lo que produjo un menor descanso de los animales. Las alteraciones en el sueño, al igual que lo descrito para los seres humanos (Smolensky y col., 2007b; Hermida y col., 2007), pueden inducir modificaciones en los ritmos circadianos de la frecuencia cardíaca (FC) y en las diferentes presiones arteriales (PAD, PAM y PAS) provocando a su vez el etomidato, una mayor depresión de la FC y un comportamiento circadiano dispar en la FC y en PAD, PAM y PAS tras la inducción anestésica realizada en verano, ya que dependería del entorno, que no es controlable y abundaría en la falta de significación encontrada.

De igual forma, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los registros de saturación de oxígeno arterial (SpO₂) entre invierno y verano en las perras estudiadas (Tabla V.76), manifestando sus correspondientes acrofases en horarios diurnos (período de actividad) en ambas estaciones; no existiendo una influencia significativa de la cantidad de horas de luz solar sobre este parámetro hemodinámico.

Por todo lo anteriormente mencionado y considerando el estudio en su conjunto, podemos decir que las gatas, como animales nocturnos, exhiben una mayor duración del efecto anestésico durante los horarios diurnos (período de descanso) (Gráficos V.4 y V.8). A su vez, poseen un comportamiento circadiano más manifiesto sobre los parámetros estudiados en invierno que en verano, prolongándose el efecto anestésico (mayor tiempo de inmovilización y mayor tiempo de recuperación anestésica) y por lo tanto exhibiendo una respuesta total anestésica más prolongada durante la época invernal (Gráfico V.1), debido probablemente a una disminución de la capacidad de eliminación (metabolismo y excreción) del xenobiótico o a una mayor sensibilidad receptorial GABAérgica.

Las perras, como animales de vida diurna, presentan un ritmo circadiano inverso al de las gatas, registrando una mayor duración de la respuesta total anestésica durante horarios nocturnos (período de descanso en esta especie) (Gráficos V.22 y V.26), coincidiendo las dos especies en cuanto a que el mayor efecto anestésico se registró durante los horarios de descanso, debido probablemente, como expresamos anteriormente, a una disminución de la capacidad de eliminación del xenobiótico o a una mayor sensibilidad receptorial GABAérgica durante este período. Sin embargo en las perras, a diferencia de lo acontecido en las gatas, no se produjeron diferencias en la duración de la anestesia entre invierno y verano. Lo que conlleva a determinar probablemente, una menor influencia de la cantidad de horas de luz sobre los ritmos circadianos en esta especie.

Con respecto a los parámetros hemodinámicos estudiados, se observó que en las gatas la mayoría de las constantes fisiológicas estudiadas durante la época invernal, exhibieron sus máximos registros (acrofases), generalmente, durante los horarios correspondientes al período de actividad, es decir durante la noche (Gráficos V.9; V.10; V.11; V.12 y V.13). En verano, en cambio, algunos parámetros manifestaron una mayor variabilidad en sus acrofases (Gráficos V.14; V.15; V.16). En las perras, durante el invierno se observó que todas las constantes fisiológicas estudiadas exhibieron sus máximos registros (acrofases) también durante los horarios correspondientes al período de actividad (diurnos) (Gráficos V.27; V.28; V.29; V.30 y V.31), en verano sin embargo, al igual que lo sucedido con las gatas, presentaron un comportamiento circadiano con una mayor variabilidad (Gráficos V.32; V.33; V.34; V.35 y V.36).

El comportamiento estival, observado en los parámetros hemodinámicos estudiados en ambas especies, puede ser explicado por una menor liberación de melatonina en esta época del año, como consecuencia de la mayor cantidad de horas de luz y por tanto, de una menor influencia de esta hormona en el comportamiento circadiano de estos parámetros hemodinámicos en verano. Por otro lado, la mayor actividad que se produce en el entorno correspondiente al alojamiento de los animales, puede modificar lo que se considera como el comportamiento habitual de cada especie, alterando la capacidad fisiológica de respuesta al anestésico.

No obstante, las variaciones obtenidas sobre los parámetros y constantes estudiadas en las dos especies, no son lo suficientemente intensas como para proponer un cambio de estrategia en los esquemas y/o protocolos anestésicos con etomidato, si bien se debería tener en cuenta que en animales de alto riesgo y en horarios extremos, las dosis del anestésico se deberían ajustar a la capacidad de cada individuo, considerando críticos los horarios matinales (entre las 07:00 h y las 13:00 h) para los gatos en invierno y los horarios nocturnos (entre las 21:00 h y las 08:00 h) para los perros en la misma estación.

VII.- Conclusiones

1.- El comportamiento circadiano del efecto anestésico de la combinación etomidato-midazolam es similar en perros y en gatos a lo largo del día, siendo mayor la duración de dicho efecto durante los períodos de descanso de los animales, es decir, en horarios matinales en los gatos y en horarios nocturnos en los perros, como consecuencia de sus menores capacidades metabólicas o modificaciones en la sensibilidad receptorial del SNC, lo que puede conllevar un ajuste de dosis especialmente en individuos de alto riesgo.

2.- La combinación etomidato-midazolam, en los gatos, provoca una diferencia importante en la duración del tiempo anestésico durante el invierno en comparación con el verano, registrándose en esta especie, un significativo aumento del tiempo anestésico durante la época invernal, lo que puede requerir un ajuste de dosis de etomidato en esta época del año, sobre todo en animales de alto riesgo anestésico. Esto no sucede con los perros, en los cuales la duración del efecto anestésico es similar en las dos estaciones del año.

3.- La combinación anestésica etomidato-midazolam mantiene en todo momento una estabilidad en el funcionamiento del sistema cardiovascular de los perros y de los gatos, independientemente de la hora del día o época del año en la que se administre. Aunque en los perros, luego de la inducción anestésica, los valores de frecuencia cardíaca, presión arterial diastólica, presión arterial media y presión arterial sistólica, son menores en verano que en invierno, si bien se mantienen dentro de los valores considerados fisiológicos. Esta variación no sucede con los gatos, en los cuales los valores de estos parámetros hemodinámicos estudiados son similares en las dos estaciones del año.

4.- En los gatos y en los perros, la mayoría de las constantes fisiológicas estudiadas exhiben, durante la época invernal, sus máximos registros (acrofases) generalmente durante el período de actividad de cada especie. En verano, en cambio, manifiestan una mayor variabilidad circadiana con acrofases en diferentes períodos (descanso o actividad). Por tanto, la menor cantidad de horas de luz solar en invierno, la consecuente mayor liberación de melatonina, unido a una menor presión medioambiental permiten ejercer una gran influencia sobre el comportamiento circadiano de los parámetros hemodinámicos en ambas especies.

5.- La combinación anestésica etomidato-midazolam produce una mayor depresión del sistema respiratorio en perros que en gatos, siendo necesaria en los primeros, un suplemento de oxígeno (O_2) a fin de alcanzar y mantener los niveles fisiológicos de saturación de oxígeno arterial (SpO_2) durante el tiempo anestésico.

6.- Las condiciones medioambientales (mayor actividad, ruidos, temperatura) que se produce en el entorno correspondiente al alojamiento de los animales durante los meses de verano, pueden modificar lo que se considera como el comportamiento habitual de cada especie en cuanto a períodos de descanso-actividad, alterando la capacidad fisiológica de respuesta a la anestesia.

VIII.- Referencias Bibliográficas

- Ahonen, J., Olkkola, K. T., Salmenpera, M., Hynynen, M., and Neuvonen, P. J. (1996). Effect of diltiazem on midazolam and alfentanil disposition in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*, 85(6), 1246-1252.
- Altamimi, M. I., Sammons, H. and Choonara, I. (2015). Inter-individual variation in midazolam clearance in children. *Archives of Disease in Childhood*, 100(1), 95-100.
- Anwar, Y. A. and White, W. B. (1998). Chronotherapeutics for cardiovascular disease. *Drugs*, 55(5), 631-643.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: Influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3(1), 13-22.
- Asp, V., Ulleras, E., Lindstrom, V., Bergstrom, U., Oskarsson, A. and Brandt, I. (2010). Biphasic hormonal responses to the adrenocorticolytic DDT metabolite 3-methylsulfonyl-DDE in human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), 281-289.
- Ates, O., Yucel, N., Cayli, S. R., Altinoz, E., Yologlu, S., Kocak, A. et al. (2006). Neuroprotective effect of etomidate in the central nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochemical Research*, 31(6), 777-783.
- Bacova, I., Svorc, P., Jr, & Bracokova, I. (2010). Chronophysiologic aspects of ECG changes during a systemic asphyxial episode and subsequent reoxygenation in an experimental rat model. *Bratislavske Lekarske Listy*, 111(3), 121-125.
- Beauchamp, D. and Labrecque, G. (2007). Chronobiology and chronotoxicology of antibiotics and aminoglycosides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9-10), 896-903.
- Bekoff, M., Daniels, T. J. and Gittleman, J. L. (1984). Life history patterns and the comparative social ecology of carnivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 191-232.
- Bendel, S., Ruokonen, E., Polonen, P. and Uusaro, A. (2007). Propofol causes more hypotension than etomidate in patients with severe aortic stenosis: A double-blind, randomized study comparing propofol and etomidate. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 51(3), 284-289.
- Benjamin, M. M. (1984). *Manual de patología clínica en veterinaria* (3a ed.). México, D.F: Limusa.
- Bergen, J. M. and Smith, D. C. (1997). A review of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *The Journal of Emergency Medicine*, 15(2), 221-230.
- Betes de Toro, M. (1994). Clinical chronopharmacology: Principles and therapeutic uses. [Cronofarmacología clínica: principios y aplicaciones terapéuticas] *Medicina Clínica*, 102(4), 150-155.
- Bienert, A., Plotek, W., Wiczling, P., Kostrzewski, B., Kamińska, A., Billert, H., et al. (2014). The influence of the time of day on midazolam pharmacokinetics and pharmacodynamics in rabbits. *Pharmacological Reports*, 66(1), 143-152.

- Bloomfield, R. and Noble, D. W. (2006). Etomidate, pharmacological adrenalectomy and the critically ill: A matter of vital importance. *Critical Care (London, England)*, 10(4), 161.
- Boggio, J. C., Valtorta, S. E., Sanchez, S. and McKellar, Q. (2001). Chronobiological variations of indomethacin pharmacokinetic parameters in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24(4), 261-265.
- Boggio, J. C., Encinas, T., Rodríguez, C., Vinagre, E., San Andrés, M. D. and San Andrés, M. I. (1998). Chronopharmacokinetic behaviour of cyproterone acetate in rabbits. *Research in Veterinary Science*, 64(2), 173-175.
- Botana López, L. M., Landoni, M. F. and Martín-Jiménez, T. (2002). SNC: Fármacos tranquilizantes. *Farmacología y terapéutica veterinaria* (1º ed. ed., pp. 161-164-166). Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana.
- Bruder, N. and Bonnet, M. (2001). Agents pharmacologiques épileptogènes en anesthésie. *Annales Françaises d'Anesthésie Et De Réanimation*, 20(2), 171-179.
- Bruguerolle, B., Giafre, E. and Prat, M. (1991). Temporal variations in transcutaneous passage of drugs: The example of lidocaine in children and in rats. *Chronobiology International*, 8(4), 277-282.
- Bruguerolle, B. and Lemmer, B. (1993). Recent advances in chronopharmacokinetics: Methodological problems. *Life Sciences*, 52(23), 1809-1824.
- Bruguerolle, B. and Prat, M. (1990). Circadian phase dependent acute toxicity and pharmacokinetics of etidocaine in serum and brain of mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(3), 201-202.
- Bruguerolle, B. (1998). Chronopharmacocinétique des médicaments. *Revue Française Des Laboratoires*, 1998(306), 53-58.
- Brussel, T., Theissen, J. L., Vigfusson, G., Lunkenheimer, P. P., Van Aken, H. and Lawin, P. (1989). Hemodynamic and cardiodynamic effects of propofol and etomidate: Negative inotropic properties of propofol. *Anesthesia and Analgesia*, 69(1), 35-40.
- Budde, A. O. and Mets, B. (2013). Pro: Etomidate is the ideal induction agent for a cardiac anesthetic. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 27(1), 180-183.
- Byku, M. and Gannon, R. L. (2000). Opioid induced non-photic phase shifts of hamster circadian activity rhythms. *Brain Research*, 873(2), 189-196.
- Cadorniga Carro, R. (1990). Chrono-pharmacokinetics. therapeutic implications. [Cronofarmacocinética. Implicaciones terapéuticas] *Anales De La Real Academia Nacional De Medicina*, 107(2), 185-214.
- Capaul, E. G. (1995). Transporte de gases a través de la sangre. In A. García Sacristán (Ed.), *Fisiología veterinaria* (1º ed., pp. 397-405). Madrid, España: McGraw-Hill - Interamericana.

- Cardinali, D. P. and Sánchez Barceló, E. J. (1994). Homeostasis reactiva y predictiva. In D. P. Cardinali, J. J. Jordá Catalá & E. J. Sánchez Barceló (Eds.), *Introducción a la cronobiología: Fisiología de los ritmos biológicos* (pp. 49). España: Servicio de publicaciones Universidad de Cantabria-Caja Cantabria.
- Cardozo de Martínez, C., de Osorio A.M., Martínez C., Yunta E.R., Lolas Stepke F. (2007). *El animal como sujeto experimental: Aspectos técnicos y éticos* Universidad de Chile. Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética. Universidad de Chile.
- Cayli, S. R., Ates, O., Karadag, N., Altinoz, E., Yucel, N., Yologlu, S. et al. (2006). Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 24(4), 233-239.
- Challet, E., Gormelen, S., Pevet, P., Oberling, P. and Pain, L. (2007). Reciprocal relationships between general (propofol) anesthesia and circadian time in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(3), 728-735.
- Chassard, D. and Bruguerolle, B. (2004). Chronobiology and anesthesia. *Anesthesiology*, 100(2), 413-427.
- Cheng, V. Y., Martin, L. J., Elliott, E. M., Kim, J. H., Mount, H. T., Taverna, F. A., et al. (2006). Alpha5GABAA receptors mediate the amnestic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(14), 3713-3720.
- Choi, J. M., Choi, I. C., Jeong, Y. B., Kim, T. H. and Hahm, K. D. (2008). Pretreatment of rocuronium reduces the frequency and severity of etomidate-induced myoclonus. *Journal of Clinical Anesthesia*, 20(8), 601-604.
- Chuang, J. I., Chen, S. S., and Lin, M. T. (1993). Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology*, 47(2), 91-97.
- Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 11, 16-4682-11-16.
- Cotten, J. F., Forman, S. A., Laha, J. K., Cuny, G. D., Husain, S. S., Miller, K. W., et al. (2010). Carboetomidate: A pyrrole analog of etomidate designed not to suppress adrenocortical function. *Anesthesiology*, 112(3), 637-644.
- Cotten, J. F., Le Ge, R., Banacos, N., Pejo, E., Husain, S. S., Williams, J. H., et al. (2011). Closed-loop continuous infusions of etomidate and etomidate analogs in rats: A comparative study of dosing and the impact on adrenocortical function. *Anesthesiology*, 115(4), 764-773.
- Cotton, B. A., Guillaumondegui, O. D., Fleming, S. B., Carpenter, R. O., Patel, S. H., Morris, J. A. Jr, et al. (2008). Increased risk of adrenal insufficiency following etomidate exposure in critically injured patients. *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, 143(1), 62-7; discussion 67.

Crowley, S. J. and Eastman, C. I. (2015). Phase advancing human circadian rhythms with morning bright light, afternoon melatonin, and gradually shifted sleep: Can we reduce morning bright-light duration? *Sleep Medicine*, 16(2), 288-297.

Danilenko, K. V. and Ivanova, I. A. (2015). Dawn simulation vs. bright light in seasonal affective disorder: Treatment effects and subjective preference. *Journal of Affective Disorders*, 180, 87-89.

Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. (2011). *InfoStat Versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional De Córdoba, Argentina*. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Dodam, J. R., Kruse-Elliott, K. T., Aucoin, D. P. and Swanson, C. R. (1990). Duration of etomidate-induced adrenocortical suppression during surgery in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 51(5), 786-788.

Doenicke, A., Kugler, A. and Vollmann, N. (1990). Venous tolerance to etomidate in lipid emulsion or propylene glycol (hypnomidate). *Canadian Journal of Anaesthesia = Journal Canadien d'Anesthésie*, 37(7), 823-824.

Doenicke, A., Roizen, M. F., Hoerneck, R., Mayer, M., Ostwald, P. and Foss, J. (1997). Haemolysis after etomidate: Comparison of propylene glycol and lipid formulations. *British Journal of Anaesthesia*, 79(3), 386-388.

Doenicke, A. W., Roizen, M. F., Kugler, J., Kroll, H., Foss, J. and Ostwald, P. (1999). Reducing myoclonus after etomidate. *Anesthesiology*, 90(1), 113-119.

Dominguez, E., Rivera Del Alamo, M. M., Novellas, R., Espada, Y., Santos, L., Garcia, F., et al. (2013). Doppler evaluation of the effects of propofol, etomidate and alphaxalone on fetoplacental circulation hemodynamics in the pregnant ewe. *Placenta*, 34(9), 738-744.

Ebling, F. J. (2010). Photoperiodic regulation of puberty in seasonal species. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324(1-2), 95-101.

EMA/CVMP/016/00-corr-FINAL. (2000) Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004304.pdf

Faya, M., Carranza, A., Priotto, M., Abeya, M., Díaz, J. D. and Gobello, C. (2011a). Domestic queens under natural temperate photoperiod do not manifest seasonal anestrus. *Animal Reproduction Science*, 129(1-2), 78-81.

Faya, M., Carranza, A., Priotto, M., Graiff, D., Zurbriggen, G., Diaz, J. D., et al. (2011b). Long-term melatonin treatment prolongs interestrus, but does not delay puberty, in domestic cats. *Theriogenology*, 75(9), 1750-1754.

- Ferrell, J. M. and Chiang, J. Y. (2015). Circadian rhythms in liver metabolism and disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(2), 113-122.
- Forsberg, M. (2002). Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. *Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo. Melibea*, 1, 121-138.
- Fraga, A. O., Malbouisson, L. M., Prist, R., Rocha E Silva, M. and Auler Junior, J. O. (2006). Anesthetic induction after treated hemorrhagic shock: Experimental study comparing ketamine and etomidate. [Indução anestésica após o tratamento do choque hemorrágico: estudo experimental comparando a cetamina e o etomidato] *Revista Brasileira De Anestesiologia*, 56(4), 377-390.
- Ge, R., Pejo, E., Cotten, J. F. and Raines, D. E. (2013). Adrenocortical suppression and recovery after continuous hypnotic infusion: Etomidate versus its soft analogue cyclopropylmethoxycarbonyl metomidate. *Critical Care (London, England)*, 17(1), R20.
- Gross, M. E. (2001). Tranquilizantes, agonistas alfa2 - adrenérgicos y compuestos relacionados. In H. R. Adams (Ed.), *Farmacología y terapéutica veterinaria* (2° Ed. ed., pp. 348-349). Zaragoza, España: Acribia.
- Guo, Y. F. and Stein, P. K. (2003). Circadian rhythm in the cardiovascular system: Chronocardiology. *American Heart Journal*, 145(5), 779-786.
- Guyton, A. C., y Hall, J. E. (2006). Distensibilidad vascular y funciones de los sistemas arterial y venoso. *Tratado de fisiología médica* (11° ed., pp. 171-180). Madrid, España: Elsevier España.
- Haessler, R., Madler, C., Klasing, S., Schwender, D. and Peter, K. (1992). Propofol/fentanyl versus etomidate/fentanyl for the induction of anesthesia in patients with aortic insufficiency and coronary artery disease. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 6(2), 173-180.
- Hamaoka, N., Oda, Y., Hase, I., Mizutani, K., Nakamoto, T., Ishizaki, T., et al. (1999). Propofol decreases the clearance of midazolam by inhibiting CYP3A4: An in vivo and in vitro study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 66(2), 110-117.
- Hamra, J. G., Kamerling, S. G., Wolfsheimer, K. J. and Bagwell, C. A. (1993). Diurnal variation in plasma ir-beta-endorphin levels and experimental pain thresholds in the horse. *Life Sciences*, 53(2), 121-129.
- Hermida, R. C., Ayala, D. E., and Portaluppi, F. (2007). Circadian variation of blood pressure: The basis for the chronotherapy of hypertension. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9-10), 904-922.
- Hille, U. E., Zimmer, C., Vock, C. A. and Hartmann, R. W. (2010). First selective CYP11B1 inhibitors for the treatment of cortisol-dependent diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 2-6.

- Hoglund, K., Hanas, S., Carnabuci, C., Ljungvall, I., Tidholm, A. and Haggstrom, J. (2012). Blood pressure, heart rate, and urinary catecholamines in healthy dogs subjected to different clinical settings. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1300-1308.
- Humble, M. B. (2010). Vitamin D, light and mental health. *Journal of Photochemistry and Photobiology.B, Biology*, 101(2), 142-149.
- Igarashi, A., Zadzilka, N. and Shirahata, M. (2009). Benzodiazepines and GABA-GABAA receptor system in the cat carotid body. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 648, 169-175.
- Ilkiw, J. (2002). Anestesia inyectable en perros - parte 1: Soluciones, dosis y administración. *International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA*.
- Ilkiw, J. E., Suter, C., McNeal, D., Farver, T. B. and Steffey, E. P. (1998). The optimal intravenous dose of midazolam after intravenous ketamine in healthy awake cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21(1), 54-61.
- Isitemiz, I., Uzman, S., Toptas, M., Vahapoglu, A., Gul, Y. G., Inal, F. Y., et al. (2014). Prevention of etomidate-induced myoclonus: Which is superior: Fentanyl, midazolam, or a combination? A retrospective comparative study. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 20, 262-267.
- Karcioglu, M., Davarci, I., Kirecci, N., Akcay, A. B., Turhanoglu, S., Tuzcu, K., et al. (2014). The development of ventricular fibrillation due to etomidate for anesthetic induction: A very rare side effect, case report. [Desenvolvimento de fibrilacao ventricular por causa de etomidato para inducao anestésica: um efeito colateral muito raro, relato de caso] *Revista Brasileira De Anestesiologia*, 64(5), 365-368.
- Kawakubo, A., Fujigaki, T., Uresino, H., Zang, S. and Sumikawa, K. (1999). Comparative effects of etomidate, ketamine, propofol, and fentanyl on myocardial contractility in dogs. *Journal of Anesthesia*, 13(2), 77-82.
- Kissin, I., Motomura, S., Aultman, D. F. and Reves, J. G. (1983). Inotropic and anesthetic potencies of etomidate and thiopental in dogs. *Anesthesia and Analgesia*, 62(11), 961-965.
- Kotas, M. E. and Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 160(5), 816-827.
- KuKanich, B. and Hubin, M. (2010). The pharmacokinetics of ketoconazole and its effects on the pharmacokinetics of midazolam and fentanyl in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33(1), 42-49.
- Kuroha, M., Azumano, A., Kuze, Y., Shimoda, M. and Kokue, E. (2002). Effect of multiple dosing of ketoconazole on pharmacokinetics of midazolam, a cytochrome P-450 3A substrate in beagle dogs. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 30(1), 63-68.

- Labrecque, G and Belanger, P. M. (1991). Biological rhythms in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 52(1), 95-107.
- Labrecque, G., Bureau, J. P. and Reinberg, A. E. (1995). Biological rhythms in the inflammatory response and in the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 66(2), 285-300.
- Lemmer, B. (2007). Chronobiology, drug-delivery, and chronotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9-10), 825-827.
- Leyva, H., Madley, T. and Stabenfeldt, G. H. (1989). Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 39, 125-133.
- López, E. F. (2007). Fisiología cardiovascular en pequeños animales. In G. C. Belerenián, C. J. Mucha, A. A. Camacho y J. Manubens-Grau (Eds.), *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales* (2º ed., pp. 17-54). Buenos Aires, Argentina: Inter-médica.
- Lovera E., Álvarez C., Severina I. (2012). *Boletines informativos digital de la E.E.A. INTA Manfredi*. URL <http://inta.gob.ar/documentos/temperaturas-promedio.-informacion-meteorologica-mensual-de-la-e.e.a.-manfredi>.
- Maddison, J. E., Page, S. W. and Church, D. B. (2004). Agentes anestésicos. *Farmacología clínica en pequeños animales* (pp. 73-74-82-94-95-96). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Malinowska-Zaprzalka, M., Wojewodzka, M., Dryl, D., Grabowska, S. Z. and Chabielska, E. (2005). Hemodynamic effect of propofol in enalapril-treated hypertensive patients during induction of general anesthesia. *Pharmacological Reports: PR*, 57(5), 675-678.
- Maranhão, M. V. M., Gomes, E. A. and De Carvalho, P. E. (2011). Epilepsy and anesthesia. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 61(2), 232-254.
- Marinsek, M., Zupan-Meznar, A., Rovani, K., Zagozen, P., Pekolj-Bicanic, M., Strmcnik, A., et al. (2008). Preoxygenation in cardioversion-related procedural sedation with etomidate and low-dose midazolam. *Annals of Emergency Medicine*, Volúmen 52(Nº 4), 46 - 47.
- Martínez-Carpio, P. A. and Corominas, A. (2004). Introducción general a la cronobiología clínica ya la manipulación terapéutica de los ritmos biológicos. *Medicina clínica*, 123(6), 230-235.
- Martinez, M. N. (1994). Generic drug appeal criteria: the 1990 bioequivalence guideline. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics (United Kingdom)*. 17; 88-91.
- Mc Kelvey, D., & Hollingshead, K. W. (2003). Agentes y técnicas anestésicas. *Manual de anestesia y analgesia veterinaria* (3º edición ed., pp. 38-40-145-146) Ed. Multimédica Ediciones Veterinarias.

Meroi, F. R., Luna, F. and Antenucci, D. (2014). Variación estacional de la tasa metabólica de reposo en *ctenomys talarum* (rodentia, ctenomyidae): Ausencia de efectos ambientales. *Mastozoología Neotropical*, 21(2), 241-250.

Meyer, D. J. y Harvey, J. W. (2000). *El laboratorio en medicina veterinaria: Interpretación y diagnóstico* (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Inter-médica.

Mochel, J. P., Fink, M., Peyrou, M., Desevaux, C., Deurinck, M., Giraudel, J. M., et al. (2013). Chronobiology of the renin-angiotensin-aldosterone system in dogs: Relation to blood pressure and renal physiology. *Chronobiology International*, 30(9), 1144-1159.

Moon, P. F. (1997). Cortisol suppression in cats after induction of anesthesia with etomidate, compared with ketamine-diazepam combination. *American Journal of Veterinary Research*, 58(8), 868-871.

Mutlak, H., Humpich, M., Zacharowski, K., Lehmann, R. and Meininger, D. (2011). Valvular heart disease: Anesthesia in non-cardiac surgery. [Herzklappenerkrankungen: Anästhesie bei nichtkardiochirurgischen Eingriffen] *Der Anaesthetist*, 60(9), 799-813.

Naber, D., Wirz-Justice, A. and Kafka, M. S. (1981). Circadian rhythm in rat brain opiate receptor. *Neuroscience Letters*, 21(1), 45-50.

Naguib, M. and Samarkandi, A. H. (2000). The comparative dose-response effects of melatonin and midazolam for premedication of adult patients: A double-blinded, placebo-controlled study. *Anesthesia and Analgesia*, 91(2), 473-479.

Nestor, N. B. and Burton, J. H. (2008). ED use of etomidate for rapid sequence induction. *The American Journal of Emergency Medicine*, 26(8), 946-950.

Norton, J. R., Ward, D. S., Karan, S., Voter, W. A., Palmer, L., Varlese, A., et al. (2006). Differences between midazolam and propofol sedation on upper airway collapsibility using dynamic negative airway pressure. *Anesthesiology*, 104(6), 1155-1164.

Ohdo, S. (2010). Chronopharmaceutics: Pharmaceutics focused on biological rhythm. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33(2), 159-167.

Ohdo, S. (2007). Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 22(1), 3-14.

Olkkola, K. T. and Ahonen, J. (2008). Midazolam and other benzodiazepines. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (182):335-60. doi(182), 335-360.

O'Meara, G. F., Newman, R. J., Fradley, R. L., Dawson, G. R. and Reynolds, D. S. (2004). The GABA-A beta3 subunit mediates anaesthesia induced by etomidate. *Neuroreport*, 15(10), 1653-1656.

Ortiz-Tudela, E., Mteyrek, A., Ballesta, A., Innominato, P. F. and Levi, F. (2013). Cancer chronotherapeutics: Experimental, theoretical, and clinical aspects. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (217):261-88. doi(217), 261-288.

- Otero, P. E. (2012). El protocolo anestésico: Pasos a seguir durante a anestesia. In P. E. Otero (Ed.), *Protocolos anestésicos y manejo del dolor en pequeños animales* (1ª ed., pp. 3-30). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Otsuka, K., Cornélissen, G. and Halberg, F. (2000). Circadian rhythms and clinical chronobiology. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55, Supplement 1(0), s7-s18.
- Oura, T., Rozanski, E. A., Buckley, G. and Bedenice, D. (2012). Low tidal volume ventilation in healthy dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex.: 2001)*, 22(3), 368-371.
- Piccione, G. and Caola, G. (2002). Biological rhythm in livestock. *Journal of Veterinary Science (Suwon-Si, Korea)*, 3(3), 145-157.
- Piccione, G., Grasso, F. and Giudice, E. (2005). Circadian rhythm in the cardiovascular system of domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 79(2), 155-160.
- Plumb, D. C. (2006). *Manual de farmacología veterinaria* (5ª ed., pp. 517). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Portaluppi, F., Tiseo, R., Smolensky, M. H., Hermida, R. C., Ayala, D. E. and Fabbian, F. (2012). Circadian rhythms and cardiovascular health. *Sleep Medicine Reviews*, 16(2), 151-166.
- Posner, L. P. (2007). Etomidate in the critically ill patient: Pros and cons. *International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org)*
- Randall, W., Johnson, R. F., Randall, S. and Cunningham, J. T. (1985). Circadian rhythms in food intake and activity in domestic cats. *Behavioral Neuroscience*, 99(6), 1162-1175.
- Rebuelto, M., Montoya, L., Ambros, L., Waxman, S. and Grubissich, J. (2003). Estudio cronobiológico de la respuesta farmacológica de la combinación ketamina-midazolam en perros. *InVet*, 5(1), 83-90.
- Rebuelto, M. (2004). Conceptos de conofarmacología: Cronofarmacología del dolor. In P. E. Otero (Ed.), *Dolor: Evaluación y tratamiento en pequeños animales* (1ª ed., pp. 81-83). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Reinberg, A., Smolensky, M. H. and Labrecque, G. (1986). New aspects in chronopharmacology. In A. R. S. LABRECQUE (Ed.), *Annual review of chronopharmacology* (pp. 3-26) Pergamon.
- Reinberg, A. E. (1992). Concepts in chronopharmacology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32, 51-66.
- Sams, L., Braun, C., Allman, D. and Hofmeister, E. (2008). A comparison of the effects of propofol and etomidate on the induction of anesthesia and on cardiopulmonary parameters in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 35(6), 488-494.

- Sasaki, K. and Shimoda, M. (2015). Possible drug–drug interaction in dogs and cats resulted from alteration in drug metabolism: A mini review. *Journal of Advanced Research*, 6(3), 383-392.
- Sato, Y., Seo, N. and Kobahashi, E. (2005). The dosing-time dependent effects of intravenous hypnotics in mice. *Anesthesia and Analgesia*, 101(6), 1706-1708.
- SIGA-Sistema de información y gestión agrometeorológico-INTA Manfredi. URL.<http://sig2.inta.gov.ar/en/estadística>. Acceso: 07/15, 2012.
- Simonneaux, V. and Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55(2), 325-395.
- Smolensky, M. H., Hermida, R. C., Castriotta, R. J., and Portaluppi, F. (2007a). Role of sleep-wake cycle on blood pressure circadian rhythms and hypertension. *Sleep Medicine*, 8(6), 668-680.
- Smolensky, M. H., Lemmer, B. and Reinberg, A. E. (2007b). Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9–10), 852-882.
- Smolensky, M. H. and Peppas, N. A. (2007). Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9-10), 828-851.
- Spainhour, C. B. (2014). Circadian clock Effects/Chronotoxicology. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of toxicology (third edition)* (pp. 969-972). Oxford: Academic Press.
- The Weather Channel Lwc. Climatología: Amanecer/anochece para Córdoba, Argentina. 2013; Availableat: <http://espanol.weather.com/climate/sunRiseSunSet/Cordoba+CA+Argentina+ARCA0023:1:AR?month=8>. Acceso 07/09, 2013.
- Thurmon, J. C., Tranquilli, W. J. and Benson, G. J. (2003). *Fundamentos de anestesia y analgesia en pequeños animales* (1ª ed. pp 1, 291, 308, 337, 342, 348, 412-420). Barcelona, España: Masson.
- Tibaduiza, S. and Benavides, O. (2006). Valores normales de la presión arterial en gatos adultos. *Visión Veterinaria*. 25(10), 29–32.
- Tverskoy, M., Fleishman, G., Ezry, J., Bradley Jr, E. L., and Kissin, I. (1989). Midazolam-morphine sedative interaction in patients. *Anesthesia and Analgesia*, 68(3), 282-285.
- Vale, N. B., Vale, L. F. and Cruz, J. R. (2009). Time and obstetric anesthesia: From chaotic cosmology to chronobiology. [O tempo e a anestesia obstétrica: da cosmologia caótica a cronobiologia] *Revista Brasileira De Anestesiologia*, 59(5), 624-647.
- Vanlersberghe, C. and Camu, F. (2008). Etomidate and other non-barbiturates. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (182):267-82. doi(182), 267-282.

- Vinik, H. R., Bradley Jr, E. L. and Kissin, I. (1994). Triple anesthetic combination: propofol-midazolam-alfentanil. *Anesthesia & Analgesia*, 78(2), 354-358.
- Vivo Rodríguez, R. (1995). Pulso arterial, venoso y capilar. Presión sanguínea. In García Sacristán, A. y col. (Ed.), *Fisiología veterinaria* (1º ed., pp. 352). Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Volume 8. Notice to applicants and Guideline Veterinary medicinal products (2005). The rules governing medicinal products in the European Union. http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-8/index_en.htm
- Wang, F., Zhang, X., Wang, J., Chen, M., Fan, N., Ma, Q., et al. (2014). LGR4 acts as a link between the peripheral circadian clock and lipid metabolism in liver. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(2), 133-143.
- Weber, M. A. (2002). The 24-hour blood pressure pattern: Does it have implications for morbidity and mortality? *The American Journal of Cardiology*, 89(2, Supplement 1), 27-33.
- Wertz, E. M., Benson, G. J., Thurmon, J. C., Tranquilli, W. J., Davis, L. E. and Koritz, G. D. (1990). Pharmacokinetics of etomidate in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 51(2), 281-285.
- Widenhorn, N., Díaz, D., Picco, E., Rebuelto, M., Encinas, T. and Boggio, J.C., (2005). Chronopharmacokinetic study of gentamicin in dogs. *Chronobiology international*, 22(4), 731-739.
- Willard, M. D., Tvedten, H. and Turnwald, G. H. (1993). *Diagnóstico clinicopatológico práctico en los animales pequeños*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Wolfe, T. R. and Braude, D. A. (2010). Intranasal medication delivery for children: A brief review and update. *Pediatrics*, 126(3), 532-537.
- Wolfe, T. R. and Macfarlane, T. C. (2006). Intranasal midazolam therapy for pediatric status epilepticus. *The American Journal of Emergency Medicine*, 24(3), 343-346.
- Yannielli, P. C. and Cardinali, D. P. (1999). *Cronobiología de la ansiedad y la depresión: su estudio en modelos animales* (Doctoral dissertation, Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires).
- Yeung, J. K. and Zed, P. J. (2002). A review of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *CJEM*, 4(03), 194-198.
- Zhang, Y., Li, R., Zhu, J., Wang, Z., Lv, S. and Xiong, J. Y. (2015). Etomidate increases mortality in septic rats through inhibition of nuclear factor kappa-B rather than by causing adrenal insufficiency. *Journal of surgical research*, 193(1), 399-406.

IX. – Anexos

Ver CD adjunto.

Anexo I Análisis Hematología y Bioquímica sanguínea

Anexo II Análisis estadístico de las gatas

Anexo III Análisis estadístico de las perras